

# **Verteilung und Funktion von Glycinrezeptoren und Gephyrin im Zentralnervensystem von Säugern**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von Felix Weltzien aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2010

vom Fachbereich 15 Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als  
Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. W. Volkandt

Prof. Dr. H. Betz

Datum der Disputation: \_\_\_\_\_

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Neuronale Transmission	1
1.2. Ruhe- und Aktionspotentiale	1
1.3. Neuronen kommunizieren über Synapsen	2
1.3.1. Signaltransduktion über chemische Synapsen	3
1.3.2. Kennzeichen chemischer Synapsen	4
1.3.2.1 Morphologie	4
1.3.2.2. Neurotransmitter	4
1.3.3. Erregende Synapsen	5
1.3.4. Hemmende Synapsen	5
1.4. Glycinrezeptoren	7
1.4.1. Aufbau von Glycinrezeptoren	7
1.4.2. Heterogenität der Glycinrezeptor-Untereinheiten	8
1.4.3. Verteilung von Glycinrezeptoren	9
1.4.4. Die Glycinrezeptor $\beta$ -Untereinheit	10
1.5. Gephyrin	10
1.5.1. Gephyrin & Glycinrezeptoren	12
1.5.2. Gephyrin & GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren	12
1.5.3. Regulierung des Gephyrin-Clusterings an inhibitorischen Synapsen	13
1.6. Die Säugetier-Retina	14
1.6.1. Zelluläre Architektur der Retina von Mäusen	14
1.6.2. Glycinerge Transmission in der Retina	16
1.6.3. Verteilung von GlyRs in der Retina	17
1.7. Ziele dieser Arbeit	18
1.7.1. Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit und Immunchemische Untersuchungen zu ihrer Verteilung	18
1.7.2. Untersuchungen zur Regulation der Gephyrin-Clusterbildung durch Phosphorylierung	19
1.7.3. Vergleichende Analyse der Genexpression im Gehirn von WT- und Gephyrin-KO-Mäusen	20

<b>2. Material &amp; Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Materialien</b>	<b>21</b>
2.1.1. Chemikalien	21
2.1.2. Puffer und Zellkulturmedien	23
2.1.2.1. Proteinchemie	23
2.1.2.2. Molekularbiologie	25
2.1.2.3. Zellkultur	26
2.1.2.4. Immunfärbungen	27
2.1.3. Kits	28
2.1.4. Primärantikörper	28
2.1.5. Sekundärantikörper	29
2.1.6. Plasmide	29
2.1.7. Oligonukleotide	30
2.1.8. Enzyme	32
2.1.9. Tiere, Zelllinien & Bakterienstämme	33
2.1.10. Verbrauchsmaterialien & Geräte	33
<b>2.2. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>35</b>
2.2.1. Plasmid-DNA-Präparation	35
2.2.2. Restriktionsverdau	35
2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.4. Transformation von Bakterien durch Elektroporation	36
2.2.5. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	36
2.2.6. RNA-Präparation aus Gehirn von Mäusen	37
2.2.7. Microarray	37
2.2.8. Reverse Transkription	38
2.2.9. PCR	39
2.2.9.1. Genotypisierung von Gephyrin-KO-Mäusen	39
2.2.9.2. Generierung von Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten	39
2.2.9.3. RT-PCR	40
2.2.9.4. qRT-PCR	41
2.2.10. Sequenzierung von PCR-Amplikons	42
<b>2.3. Zellbiologische Methoden</b>	<b>43</b>
2.3.1. Kultivierung von HEK293T-Zellen	43

2.3.2. Passagieren von HEK293T-Zellen	43
2.3.3. Transfektion von HEK293T-Zellen mit Plasmiden mittels Lipofectamine® 2000	43
2.3.4. Infektion von HEK293T-Zellen mit AAV-Vektoren mittels der Ca <sup>2+</sup> -Phosphat-Methode	44
2.3.5. Reinigung von Viruspartikeln	44
2.3.6. Präparation und Kultivierung von murinen Hippocampusneuronen	45
2.3.7. Transfektion von Hippocampusneuronen mit Lipofectamine® 2000	47
2.3.8. Präparation und Kultivierung von murinen Rückenmarksneuronen	47
2.3.9. Immunocytochemie	48
<b>2.4. Histologische Methoden</b>	<b>48</b>
2.4.1. Präparation von Maus-Retina	48
2.4.2. Präparation von murinem Hirn und Rückenmark	49
2.4.3. Anfertigung von Kryoschnitten	50
2.4.4. Immunfärbung von Kryoschnitten	50
2.4.5. Quantifizierung von immunreaktiven Synapsen in Zellkultur und Hirnschnitten	51
<b>2.5. Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>52</b>
2.5.1. Reinigung von Glycinrezeptoren aus Rückenmark	52
2.5.1.1. Präparation von rohen synaptischen Membranen (Rosy)	52
2.5.1.2. Solubilisierung von Glycinrezeptoren aus Rosy	53
2.5.1.3. Reinigung von Glycinrezeptoren über 2-Aminostrychnin-Agarose	53
2.5.2. Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E.coli</i>	54
2.5.2.1. Expression von Proteinen in Bakterien	54
2.5.2.2. Herstellung von geklärtem Bakterienlysat	54
2.5.2.3. Reinigung von GST-Fusionsprotein aus Bakterienlysat	55
2.5.2.4. Elution von immobilisiertem GST-Fusionsprotein durch Trombinspaltung	56
2.5.2.5. Entfernung von Thrombin aus Lösungen durch Benzamidinsäulen	56
2.5.3. Proteinanalytik	57
2.5.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
2.5.3.2. Coomassie Brilliant Blue (CBB)-Färbung von Acrylamid-Gelen	58
2.5.3.3. Kolloidale Silberfärbung von Acrylamid-Gelen	59
2.5.3.4. Western Blot	59
2.5.3.5. Proteindetektion mittels Chemilumineszenz	59
2.5.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen	60
2.5.4. Herstellung monoklonaler Antikörper	60

2.5.4.1. Immunisierung von Mäusen	61
2.5.4.2. Fusion von B-Lymphozyten und Plasmazellen	61
2.5.3.3. ELISA	61

## **3. Ergebnisse** **62**

<b>3.1. Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen die Glycinrezeptor-<math>\beta</math>-Untereinheit (GlyR<math>\beta</math>)</b>	<b>62</b>
3.1.1. Herstellung und Aufreinigung des Antigen-Peptids	62
3.1.2. Untersuchung von Hybridoma-Mischklon-Überständen	64
3.1.3. Immuncytochemische Tests mit Hybridoma-Überständen	66
3.1.4. Färbungen endogener Glycinrezeptoren im Western Blot	68
3.1.5. Identifikation der Antikörper-Bindestelle von mGlyR $\beta$	69
3.1.6. Hemmung der mGlyR $\beta$ -Bindung durch ein Epitop-Peptid	70
3.1.7. Spezifität des mGlyR $\beta$ Antikörpers in immuncytochemischen Experimenten	72
3.1.8. Färbung von synaptisch lokalisiertem GlyR $\beta$ in Neuronenkulturen	73
3.1.9. Färbung der GlyR $\beta$ -Untereinheit in Hirnschnitten	74
3.1.10. Verteilung der GlyR $\beta$ -Untereinheit im Mausgehirn	77
<b>3.2. Immunhistochemische Untersuchungen an der Mausretina</b>	<b>78</b>
3.2.1. Lokalisation von GlyR $\beta$ in der Retina von Mäusen	78
3.2.2. Kolokalisation von GlyR $\beta$ mit Gephyrin	80
3.2.3. Kolokalisation von GlyR $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten	80
3.2.4. Kolokalisation von Gephyrin und GlyR $\alpha$ 1-4 in der Retina	83
3.2.5. Spezifität der GlyR $\alpha$ 4-Färbung in Stratum 3/4 der IPL von Maus-Retina	85
3.2.6. Subzelluläre Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4 in Stratum 3/4 der IPL	85
<b>3.3. Untersuchungen zur Regulation postsynaptischer Gephyrincluster durch Phosphorylierung</b>	<b>87</b>
3.3.1. Ermittlung potentieller Phosphorylierungsstellen von Gephyrin	87
3.3.2. Expression von GFP-Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten in HEK293T-Zellen	88
3.3.3. Synaptische Lokalisation von GFP-Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten in hippocampalen Neuronen	90
3.3.4. Kolokalisation von Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten mit GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren in hippocampalen Neuronen	92

<b>3.4. Vergleichende Analyse der Genexpression in Wildtyp- und Gephyrin-defizienten Mäusen</b>	<b>94</b>
3.4.1. Genotypisierung von Mäusen	94
3.4.2. RNA-Aufreinigung aus Maus-Cortices	95
3.4.3. Expressionschip-Daten	96
3.4.4. RT-PCR von Kandidatengen	97
3.4.5. Weitere Untersuchungen der Kandidatengene	98
<b>4. Diskussion</b>	<b>100</b>
4.1. Ein monoklonaler Antikörper gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit	100
4.1.1. Validierung der Antikörperspezifität	100
4.1.2. Lokalisation von GlyR $\beta$ im Zentralnervensystem der Maus	102
4.1.3. Färbung von GlyR $\beta$ in der Mausretina	103
4.1.4. Koloalokalisation von GlyR $\beta$ und Gephyrin mit GlyR $\alpha$ 1-4 in der Mausretina	104
4.1.5. Implikationen für die GlyR-Zusammensetzung an ON- <i>Starburst</i> -Amakrinzellen	106
4.2. Regulation der Clusterbildung von Gephyrin	107
4.2.1. Einfluss von Phosphataseinhibitoren auf Gephyrincluster	107
4.2.2. Phosphorylierungsmutanten rekrutieren Dlc1 und ena/VASP in intrazelluläre Blobs	108
4.2.3. Subzelluläre Lokalisation der Gephyrinmutanten in Neuronen	109
4.3. Vergleichende Analyse der Genexpression im Gehirn von WT- und Gephyrin-KO-Mäusen	111
4.3.1. Bewertung der Expressionsprofile von Gephyrin-KO-Mäusen	111
4.3.2. Mögliche Kandidatengene	112
4.4. Ausblick	114
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>

## II. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AraC	Cytarabin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
A.U.	<i>arbitrary unit</i> (willkürliche Einheit)
BES	N, N-bis(hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonat
BN	Blue Native
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	<i>circular DNA</i> (zirkuläre DNS)
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DIV	<i>days in vitro</i> (Tage in Kultur nach Präparation)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle (Zellkultur-)Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemolumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (enzymgek. Immunabsorptionstest)
g	Zentrifugalbeschleunigung; Gramm
GABA	$\gamma$ - <i>aminobutyric acid</i> ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)
GCL	<i>ganglion cell layer</i> (Ganglienzellschicht)
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i> (Guaninnukl.-Austauschfaktor)
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
gt	Antikörper aus Ziege ( <i>goat</i> )
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i> (humane embryonale Nierenzellen)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)

Ig	Immunglobulin
INL	<i>inner nuclear layer</i> (innere Zellkorperschicht)
IPL	<i>inner plexiform layer</i> (innere plexiforme Schicht)
IR	infrarot
IS	<i>inner photoreceptor segment</i> (inneres Photorezeptorsegment)
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i> (Gendeletion)
m	Antikörper aus Maus ( <i>mouse</i> ); milli; Masse
M	Molar
mA	Milliampère
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight</i>
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i> (Zellkulturmedium)
min	Minute(n)
MilliQ Wasser	Reinstwasser (demineralisiert)
$M_r$	apparentes Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
$\mu$	mikro
NDS	<i>normal donkey serum</i> (normales Eselserum)
NGS	<i>normal goat serum</i> (normales Ziegenserum)
nm	Nanometer
NP40	Nonidet® P40, Nonylphenyl-polyethylenglykol
ONL	<i>outer nuclear layer</i> (äußere Zellkorperschicht)
OPL	<i>outer plexiform layer</i> (äußere plexiforme Schicht)
OS	<i>outer photoreceptor segment</i> (äußereres Photorezeptorsegment)
PEG(3000)	Polyethylenglycol mit Molekulargewicht von 3000 Da
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PSD	<i>postsynaptic density</i> (postsynaptische Dichte)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i> (quantitative Echtzeit-PCR)
rb	Antikörper aus Kaninchen ( <i>rabbit</i> )
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
Rosy	Rohe synaptische Membranen
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i> (Reverse-Transkriptase-PCR)
s	Sekunde(n)
S	Svedberg-Einheit
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
t	Zeit
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)

TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tween® 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
UV	ultraviolett
u	<i>unit</i> (Enzymaktivität)
U	Spannung
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VIAAT	<i>vesicular inhibitory aminoacid transporter</i> (vesik. inhib. AS-Transporter)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
2D	zweidimensional
∅	Durchmesser

# 1. Einleitung

## 1.1. Neuronale Transmission

Die Welt, in der wir leben, ist von ständiger Veränderung geprägt. Um zu überleben ist es für alle Organismen zwingend erforderlich, sich diesen Veränderungen anzupassen. Von außen auf Lebewesen eintreffende Reize müssen aufgenommen und verarbeitet werden und eine definierte Reaktion zur Folge haben. Dies gilt sowohl für Bakterien, welche als Reaktion auf Nährstoffmangel multi-resistente Sporen ausbilden, als auch für Pflanzen, die sich in Richtung Sonne neigen. In der von schnellen Bewegungen geprägten Tierwelt wurde durch die Entstehung von Nervenzellgeweben ein sprunghafter Anstieg in der Geschwindigkeit der Informationsübertragung zwischen Innen- und Außenwelt erreicht. Die Zeitspanne zwischen Reiz und Reaktion konnte durch neuronale Signaltransmission auf wenige tausendstel Sekunden minimiert werden. Nervenzellgewebe nehmen hierbei den über einzelne Sinneszellen in elektrische Signale umgewandelten Reiz auf, verarbeiten ihn und geben dann entsprechende Signale z.B. an Muskel- oder Drüsengewebe weiter. Die Verschaltung von Neuronen zur Informationsverarbeitung nimmt mit der Komplexität der Reizantworten zu. Dementsprechend reicht die Spanne im Tierreich vom einfachen Nervennetz der Hydra mit wenigen tausend Neuronen, bis hin zum Gehirn des Menschen mit ca. 100 Milliarden Neuronen, von denen jedes an ca. 1000 Kontaktpunkten, sogenannten Synapsen, mit anderen Nervenzellen verbunden ist.

## 1.2. Ruhe- und Aktionspotentiale

Nervenzellen werden an einer oder mehreren Stellen mit Informationen gespeist. Sie bündeln und verrechnen diese, und leiten dann die Informationen in Form von Aktionspotentialen an nachgeschaltete Neuronen oder Effektoren wie Muskeln oder Drüsen weiter.

Jedes Neuron kann aufgrund seiner elektrochemischen Eigenschaften in zwei Zuständen vorliegen; einem ruhenden, in dem es keine Signale propagiert, und in einem aktiven Zustand, in welchem es Aktionspotentiale durch das Axon in Richtung Synapsen feuert. Im nicht-erregten Zustand besitzt ein Neuron eine Membranpotential von  $-70$  bis  $-90$  mV, das sogenannte Ruhepotential (Huxley & Stämpfli, 1951). Dieses Potential ist der ungleichen Verteilung geladener Teilchen (Ionen) über die Plasmamembran geschuldet. Im Zellinneren befindet sich eine höhere Konzentration negativ geladener Teilchen (Anionen) als in der extrazellulären Flüssigkeit. Die

Plasmamembran der Neuronen enthält jedoch viele Proteine, die als Ionenkanäle fungieren. Diese gewähren selektiv bestimmten Ionen den Übertritt von einer auf die andere Seite der Membran. Die Spannung, die in ruhenden, nicht erregten Neuronen über der Membran herrscht, bezeichnet man als Ruhepotential. Ein Teil der in die Zellmembran eingelassenen Ionenkanäle ist permanent geöffnet. Demnach sickern ständig Ionen durch die Membran hindurch und verändern so das Fließgleichgewicht von elektrischen und chemischen Gradienten, welche das Ruhepotential ausmachen. Um eine Stabilisierung des Ruhepotentials zu erreichen, müssen daher Ionen unter Energieverbrauch entgegen ihrem Konzentrationsgefälle auf die andere Seite der Membran gepumpt werden. Dieser energetisch aufwendige Pumpprozess (ca. 30% des Energiebedarfs des Gehirns) versetzt Neuronen in die Lage, ein konstantes Ruhepotential von -70 bis -90 mV aufrecht zu erhalten.

Sinneszellen und sensorische Neuronen wirken über definierte Kontaktstellen, die Synapsen, auf nachgeschaltete Neuronen ein. Dies geschieht, indem sie die Membranleitfähigkeit der innervierten Zelle verändern, was zu Potentialänderungen führt. Diese Veränderungen können zu einer Erhöhung der Spannung (Hyperpolarisation) oder auch zu einer Verringerung der Spannung (Depolarisation) über der Membran führen. Erst wenn ein Neuron über einen bestimmten Schwellenwert depolarisiert wird, löst es ein sogenanntes Aktionspotential aus. Eine Depolarisation um etwa 20 mV bringt spannungsgesteuerte Na<sup>+</sup>-Kanäle in der Membran des Axons dazu, von einem ruhenden in einen aktivierten Zustand überzugehen und sich zu öffnen. Na<sup>+</sup>-Ionen strömen nun vermehrt ins Zellinnere und depolarisieren die Zelle weiter. Auf diese Weise werden in Neuronen Aktionspotentiale generiert. Aktionspotentiale entstehen in Neuronen am initialen Segment des Axons, dem sogenannten Axonhügel. Von hier aus wird das Aktionspotential durch das Axon bis hin zu synaptischen Kontakten auf anderen Neuronen oder Effektorzellen geleitet.

### **1.3. Neuronen kommunizieren über Synapsen**

Die Stellen eines Neurons, an denen Signale auf andere Zellen übertragen werden, oder an denen es selbst von anderen Zellen innerviert wird, nennt man Synapsen. An diesen Kontaktpunkten wird die elektrische Information auf die nachgeschaltete Zelle übertragen. Grundsätzlich kann dies auf zwei verschiedenen Wegen geschehen - durch eine direkte elektrische Kopplung oder durch die Übertragung mittels chemischer Botenstoffe. Die Kopplung durch elektrische Synapsen dient der schnellen Signalübertragung von Zelle zu Zelle. An derartigen Synapsen werden zwei Zellen durch Verbindungskanäle aus Connexin-Proteinen,

die sogenannten *Gap junctions*, gekoppelt. Eintreffende Signale werden unmittelbar auf die nachgeschaltete Zelle übertragen (Hormuzdi *et al.*, 2004).

An chemischen Synapsen werden Botenstoffe, sogenannte Neurotransmitter, ausgeschüttet, die Rezeptoren auf der nachgeschalteten Zelle aktivieren. Je nachdem ob ein Signal zu einer Depolarisation oder einer Hyperpolarisation führt, spricht man von erregender (exzitatorischer) oder hemmender (inhibitorischer) Signalübertragung. Die Signalübertragung über chemische Synapsen ist variabel als die über elektrische Synapsen. Hier können Signale verstärkt, gedämpft, erregend oder inhibitorisch auf die nächste Zelle wirken. Daher lassen sich komplexe neuronale Schaltkreise und plastische Lernvorgänge besser mittels chemischer Signalübertragung aufbauen. Grundsätzlich verläuft die Signalübertragung im Gehirn zur großen Mehrheit über chemische Synapsen.

### **1.3.1. Signaltransduktion über chemische Synapsen**

An chemischen Synapsen gibt es, im Gegensatz zu elektrischen Synapsen, keine durchgängigen Zell-Zell-Verbindungen. Die verbreiterte Endigung eines Nervenfortsatzes ist von der nachgeschalteten Zelle durch den sogenannten synaptischen Spalt getrennt. Anhand der Laufrichtung des Signals unterscheidet man von diesem Spalt ausgehend die aufeinandertreffenden Nervenzellbereiche in Prä- und Postsynapse. Präsynaptische Nervenendigungen sind zum synaptischen Spalt hin leicht verbreiterte Strukturen, welche daher auch als synaptische Endknöpfchen bezeichnet werden. Diese Endknöpfchen enthalten eine Vielzahl von kleinen, mit Neurotransmittern gefüllten Membranbläschen, die synaptischen Vesikel. Ein über das Axon in die Präsynapse einlaufendes Aktionspotential öffnet spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Der folgende  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bringt die Vesikel dazu, an bestimmten Bereichen, den sogenannten aktiven Zonen, mit der Plasmamembran zu fusionieren. Neurotransmitter werden so in den synaptischen Spalt freigegeben. Getrieben durch Diffusionskräfte gelangen die Neurotransmitter zur postsynaptischen Membran, welche mit Neurotransmitter-Rezeptoren besetzt ist. Durch die Bindung der Neurotransmitter an die entsprechenden Rezeptoren werden diese aktiviert. Ihre Aktivierung führt, direkt oder indirekt, zur Öffnung von Ionenkanälen, was eine Potentialänderung der nachgeschalteten Zelle zur Folge hat.

Im Unterschied zu elektrischen Synapsen kann durch die Übersetzung des elektrischen Signals in chemische Botenstoffe Information auf vielfältige Weise moduliert werden. So können verschiedene Mengen von Neurotransmittern ausgeschüttet werden. Rezeptoren liegen in

unterschiedlicher Dichte über die Membran verteilt vor und induzieren nach ihrer Aktivierung einen selektiven Fluss bestimmter Ionen durch die Membran. Diese Eigenschaften führen dazu, dass eine chemische Synapse unterschiedlich stark und entweder exzitatorisch oder inhibitorisch wirken kann.

## **1.3.2. Kennzeichen chemischer Synapsen**

### **1.3.2.1 Morphologie**

Morphologisch lassen sich zwei grundlegende Arten von Synapsen unterscheiden. Sie werden, nach E.G. Gray, der elektronenmikroskopische Studien hierzu durchführte, als Gray Typ-1 und -2 Synapsen bezeichnet (E.G. Gray, 1949). Gray Typ-1 Synapsen besitzen einen relativ weiten synaptischen Spalt, von ca. 30-40 nm Breite. Die aktive Zone der Präsynapse erstreckt sich über 1-2  $\mu\text{m}^2$  Membranfläche. Die enthaltenen synaptischen Vesikel weisen eine runde Form auf. Im synaptischen Spalt und auf der cytosolischen Seite der postsynaptischen Membran befinden sich große Mengen von elektronendichtem Material, welches auch als postsynaptische Dichte bezeichnet wird. Gray Typ-2 Synapsen besitzen einen schmalen synaptischen Spalt von etwa 20 nm Breite. Die aktive Zone ist meist kleiner ( $<1 \mu\text{m}^2$ ), und die postsynaptische Dichte nicht so stark ausgeprägt wie bei Typ-1 Synapsen. Ein weiteres auffälliges Merkmal ist die ovale Form der synaptischen Vesikel. Funktionelle Untersuchungen der unterschiedlichen Synapsentypen zeigten, dass Gray Typ-1 Synapsen meist erregende Signale übertragen, während Typ-2 Synapsen hemmend auf die nachgeschalteten Zellen wirken.

### **1.3.2.2. Neurotransmitter**

Synapsen können nach der Art des ausgeschütteten Neurotransmitters klassifiziert werden. Die Moleküle, die als Neurotransmitter fungieren, weisen sehr unterschiedliche Strukturen auf. Zu ihnen gehören Acetylcholin, das Hormon Adrenalin, die biogenen Amine Dopamin und Serotonin, sowie die Aminosäuren Glutamat, Glycin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und auch Peptide. Die Art des freigesetzten Neurotransmitters trägt jedoch nicht immer eindeutig zur Charakterisierung einer Synapse bei, denn ein und derselbe Neurotransmitter kann unterschiedliche Signale auf die postsynaptische Zelle übertragen. Ausschlaggebend für die Transmitterwirkung ist hierbei der postsynaptische Rezeptor, der von dem jeweiligen Transmitter aktiviert wird.

### 1.3.3. Erregende Synapsen

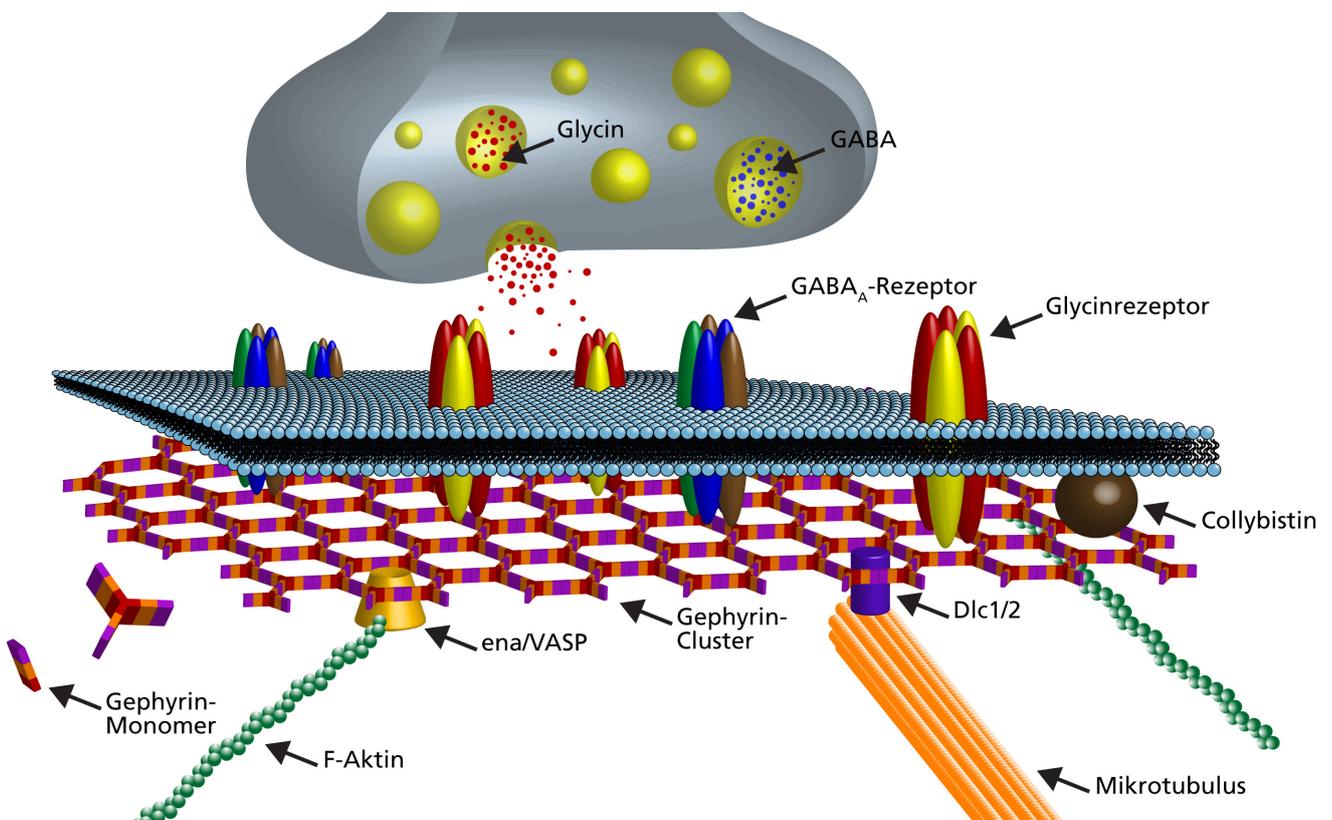
Führt die Aktivierung postsynaptischer Rezeptoren durch ausgeschüttete Neurotransmitter zur Depolarisation der Postsynapse, spricht man von exzitatorischer Signalübertragung (Gundelfinger & tom Dieck 2000). An neuromuskulären Verbindungen werden eintreffende Aktionspotentiale durch Aktivierung von Acetylcholinrezeptoren auf das Muskelgewebe übertragen. Im Gehirn ist Glutamat der häufigste erregende Neurotransmitter. Innerhalb der Gruppe der Glutamatrezeptoren unterscheidet man zwischen ionotropen und metabotropen Rezeptoren. Ionotrope Glutamatrezeptoren sind Kanal-bildende Rezeptorproteine. Diese lassen sich wiederum nach ihren spezifischen Agonisten, AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure), Kainat und NMDA (N-Methyl-D-aspartat), unterscheiden (Wisden&Seeburg, 1993). Ebenso wie Acetylcholinrezeptoren leiten auch Glutamat-gesteuerte Ionenkanäle hauptsächlich  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen. Ihre Aktivierung führt immer zur Depolarisation der postsynaptischen Membran. Im Gegensatz zu den ionotropen Glutamatrezeptoren induzieren metabotrope Glutamatrezeptoren die Öffnung von Ionenkanälen indirekt über G-Protein gekoppelte Signalwege. Ihre Aktivierung kann sowohl erregend als auch hemmend wirken.

### 1.3.4. Hemmende Synapsen

An hemmenden Synapsen führt die Neurotransmitter-Bindung an einen Rezeptor zur Öffnung von Ionenkanälen, welche die postsynaptische Membran hyperpolarisieren. Hierdurch sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass das innervierte Neuron durch die Summe der eingehenden Signale über den Schwellenwert depolarisiert und so ein Aktionspotential ausgelöst wird. GABA und Glycin sind die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des Zentralnervensystems (ZNS). Die Aktivierung von Glycin- und GABA-Rezeptoren führt zur Öffnung von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen, was einen Einstrom von Chlorid-Ionen in die Zelle und somit eine Hyperpolarisation zur Folge hat. Der inhibitorische Glycinrezeptor (GlyR) und der  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor sind also ionotrope Rezeptoren. Ihre Aktivierung führt direkt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit von  $\text{Cl}^-$ -Ionen durch den Rezeptor-Kanal (Lüscher & Keller, 2007).  $\text{GABA}_B$ -Rezeptoren sind hingegen metabotrop und arbeiten über einen G-Protein-Signalweg. Die Aktivierung von  $\text{GABA}_B$ -Rezeptoren induziert die Schließung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen an präsynaptischen Nerventerminalien und unterdrückt so die Ausschüttung von Neurotransmittern (Ulrich & Bettler, 2007).

Die Hyperpolarisation von Neuronen durch hemmende Synapsen ist von zentraler Bedeutung im ZNS, da hierdurch die Reizantworten von Neuronen moduliert und koordiniert werden können. Hemmende und erregende Eingänge werden durch die Dendriten des

Neurons in Richtung Soma geleitet und dort integriert. Die Summe der eintreffenden Signale mit unterschiedlichen Stärken und Vorzeichen entscheidet darüber, ob ein Neuron ein Aktionspotential auslöst oder nicht. Das Fehlen von hemmenden Eingängen führt folglich dazu, dass Neuronen um ein Vielfaches mehr erregt werden und somit weit häufiger Aktionspotentiale feuern als Neurone mit vielen hemmenden Eingängen. Den gesamten Organismus betrachtend kann solch eine fehlende Hemmung zu Krämpfen und auch schwerwiegenden Erkrankungen wie Hyperekplexie, Epilepsie, Angstzuständen und Schizophrenie führen (Harvey *et al.*, 2008; Hirose *et al.*, 2003; Scheffer & Berkovic, 2003; Johnson *et al.*, 2010; Guidotti *et al.*, 2005). Der Aufbau einer hemmenden Synapse ist in **Abb. 1** schematisch dargestellt.



**Abb. 1:** Schematischer Aufbau einer hemmenden Synapse. An der Präsynapse werden Glycin und/oder GABA in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, was zur Aktivierung von Rezeptoren in der postsynaptischen Membran führt. Gephyrin bildet vermutlich ein hexagonales Netzwerk, welches als Ansammlung (engl. *cluster*) an der cytosolischen Seite der postsynaptischen Membran aufliegt und dort Glycin- sowie GABA-Rezeptoren dicht packt. Das Gephyrincluster ist wiederum über Adapterproteine wie ena/VASP und dynein light chain 1/2 (Dlc1/2) mit dem Cytoskelett verbunden. Weitere Gephyrin-Bindeproteine wie Collybistin sind an der Regulation der Clusterbildung beteiligt.

Bassoon ist ein präsynaptisches cytosolisches Gerüstprotein, welches an der aktiven Zone von exzitatorischen und inhibitorischen Präsynapsen angereichert ist (Tom Dieck & Brandstätter,

2006) und oft als synaptisches Markerprotein für Nervenendigungen in der Immunhistochemie herangezogen wird.

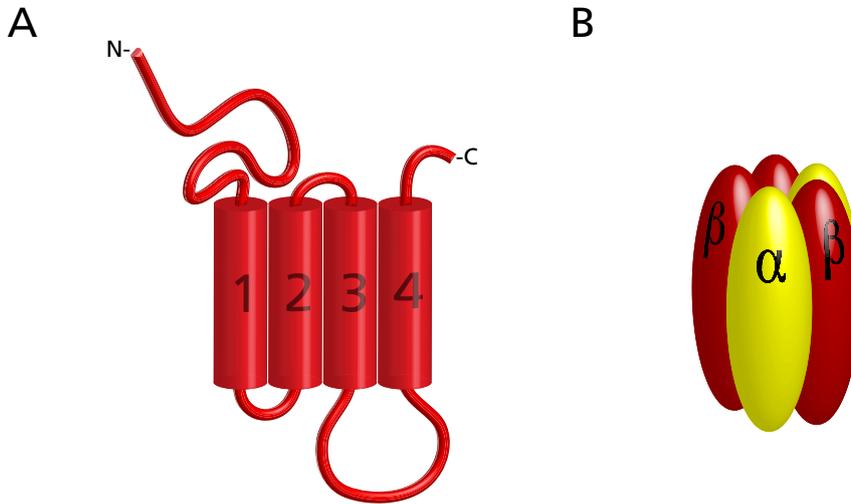
## 1.4. Glycinrezeptoren

Genauso wie die Acetylcholin-, GABA<sub>A</sub>- und Serotoninrezeptoren gehört der inhibitorische Glycinrezeptor (GlyR) zur Familie der ligandengesteuerten Cystein-Schleifen-Ionenkanäle. Die Bindung von Glycin an den Rezeptor induziert eine Konformationsänderung und somit die Öffnung des Cl<sup>-</sup>-selektiven Ionenkanals. In reifen Neuronen induziert dies einen Cl<sup>-</sup>-Einstrom in die Zelle, was eine Hyperpolarisation der Membran zur Folge hat. Hierdurch wird, wie oben beschrieben, neuronale Aktivität effizient unterdrückt. Strychnin ist ein kompetitiver Antagonist der Glycinbindung am Rezeptor. Vergiftungen durch Strychnin bewirken daher eine Verminderung der GlyR-vermittelten neuronalen Hemmung, was wiederum zu neuronaler Übererregung führt und so Muskelspasmen und Krämpfe auslöst.

### 1.4.1. Aufbau von Glycinrezeptoren

Wie alle Mitglieder dieser Rezeptorfamilie ist der GlyR ein Proteinkomplex, welcher sich aus fünf Untereinheiten zusammensetzt (Pentamer). Jede Untereinheit besitzt vier hydrophobe Transmembrandomänen (TMD) in Form von  $\alpha$ -Helices. N- und C-Terminus ragen in den synaptischen Spalt, während eine kleine und eine große Proteinschleife zwischen TMD1 und 2, bzw. TMD3 und 4 auf der cytosolischen Seite der Membran liegen. Die N-terminale Domäne besitzt einen stark konservierten Cystein-Loop. Für die  $\alpha$ 1-Untereinheit konnte gezeigt werden, dass sich die Strychnin-Bindestelle N-terminal vor der ersten Transmembrandomäne befindet und sich aus zwei Subdomänen zusammensetzt (Graham *et al.*, 1983; Ruiz-Gomez *et al.*, 1990; Vandenberg *et al.*, 1992a). Die Glycinbindetasche wird, je nach Rezeptormultimer, durch Zusammenlagerung von Subdomänen der N-Termini von  $\alpha$ - oder  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gebildet (Vandenberg *et al.*, 1992b; Grudzinska *et al.*, 2005). Die Bindung von Glycin an den Rezeptor ist nur nach vollständiger Assemblierung der Untereinheiten möglich. Die Untereinheiten-Zusammensetzung ist hierbei von entscheidender Bedeutung für die Glycin-/Strychnin-Bindungsaffinitäten und die Dosis-Antwort Kurven des funktionalen Rezeptors (Schmieden *et al.*, 1992; Kuhse *et al.*, 1993). Die Pore des Ionenkanals wird von den  $\alpha$ -Helices der TMD2 jeder Untereinheit flankiert. Nur die  $\alpha$ -Untereinheiten sind in der Lage, funktionale Homomere zu bilden, wohingegen  $\beta$ -Untereinheiten keine homomeren Rezeptoren bilden

können. Lediglich durch Assemblierung mit  $\alpha$ -Untereinheiten können sie funktionale Rezeptoren bilden. Derartige heteromere Rezeptoren aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten setzen sich mit einem stöchiometrischen Verhältnis von  $2\alpha:3\beta$  zusammen (Grudzinska *et al.*, 2005; siehe **Abb. 2**).



**Abb. 2: Aufbau und Struktur von Glycinrezeptoren.**  
**A:** Jede GlyR-Untereinheit enthält vier TMDs. N- und C-Terminus liegen auf der extrazellulären Seite der Membran. TMD3 und 4 sind über eine große cytoplasmatische Schleife miteinander verbunden.  
**B:** Synaptische GlyRs in adulten Neuronen liegen vermutlich als Heteropentamere aus  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheiten mit einer Stöchiometrie von  $2\alpha:3\beta$  vor.

#### 1.4.2. Heterogenität der Glycinrezeptor-Untereinheiten

Die Transkripte der GlyR-Untereinheiten  $\alpha 1-3$  und  $\beta$  können durch alternatives Splicing verändert werden. Für GlyR $\alpha 1$  beispielsweise wurde im Rückenmark von Ratten eine Splicevariante gefunden (GlyR $\alpha 1^{ins}$ ), welche von AS 328 an zusätzliche 8 neutrale, im Cytoplasma gelegene Aminosäuren (AS) enthält (Malosio *et al.*, 1991a). GlyR $\alpha 2$  liegt im pränatalen Rattenhirn in zwei Splicevarianten, GlyR $\alpha 2A$  und GlyR $\alpha 2B$  vor, welche sich jedoch nur in zwei Aminosäuren unterscheiden (Kuhse *et al.*, 1991). In fötalen cDNA-Banken des menschlichen Hirns wurden eine kurze und eine lange Splicevariante von GlyR $\alpha 3$  (GlyR $\alpha 3K$ , GlyR $\alpha 3L$ ) gefunden. Diese unterscheiden sich um 15 AS in ihrer Länge und auch in ihren Desensitisierungskinetiken (Nikolic *et al.*, 1998). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von GlyR $\alpha 3$  für das gesteigerte Schmerzempfinden bei Entzündungen wichtig ist (Harvey *et al.*, 2004). In Ratten kommt diese Untereinheit aufgrund von RNA-Editing und die daraus resultierende Desaminierung eines Cytosinrestes, auch als GlyR $\alpha 3^{P185L}$  vor (Meier *et al.*, 2005). Für GlyR $\beta$  wurde in verschiedenen Organen der Ratte eine Splicevariante gefunden, in der sieben AS fehlen, wodurch sich N-terminal von TMD3 die Topologie des Proteins substanziell ändern könnte (Oertel *et al.*, 2007).

Über die GlyR  $\alpha 4$ -Untereinheit ist vergleichsweise wenig bekannt. Sie wurde erst als letztes

der vier Gene für GlyR $\alpha$ -Untereinheiten kloniert (Matzenbach et al., 1994; Harvey *et al.*, 2000). Bei Hühnern wurden GlyR $\alpha$ 4-Transkripte in der Genitalleiste und dem Rückenmark gefunden (Harvey *et al.*, 2000). Im menschlichen Genom hingegen ist das vermeintliche GlyR $\alpha$ -Gen in seiner Sequenz durch ein Stop-Codon unterbrochen, weshalb man davon ausgeht, dass GlyR $\alpha$ 4 im Menschen nur als Pseudogen vorliegt (Simon *et al.*, 2004). In Mäusen wurde GlyR $\alpha$ 4-Protein immunocytochemisch in der inneren plexiformen Schicht der Mausretina nachgewiesen (Heinze *et al.*, 2007).

### 1.4.3. Verteilung von Glycinrezeptoren

Der Zusammenbau von GlyR-Untereinheiten zu funktionalen Rezeptoren geschieht im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat von Neuronen. Die einzelnen Rezeptor-Untereinheiten werden dabei im Golgi-Apparat glykosyliert. Nur assemblierte und korrekt glykosylierte Rezeptorkomplexe werden über weitere Transportmechanismen an die Membran gebracht (Griffon *et al.*, 1999). Vermutlich führt die Überexpression einzelner GlyR-Untereinheiten in immortalisierten Säugerzelllinien zu einer starken Anreicherung der Proteine im ER, da in diesen heterologen Systemen eine korrekte Assemblierung nicht gegeben ist und der weitere Transport der GlyRs zur Membran daher versperrt bleibt. Dies gilt besonders für GlyR $\beta$ -Untereinheiten, welche alleine nicht zu funktionellen Pentameren assembliert werden können und nur komplexiert mit  $\alpha$ -Untereinheiten die Zelloberfläche erreichen.

Die Untereinheiten-Zusammensetzung der GlyRs ändert sich im Laufe der Entwicklung des Gehirns. In pränatalen Entwicklungsstadien werden keine oder nur sehr geringe Mengen der  $\beta$ -Untereinheiten exprimiert. GlyRs liegen hier in den sogenannten pränatalen Isoformen vor, welche allein aus  $\alpha$ -Untereinheiten, meist GlyR $\alpha$ 2 Homomeren, bestehen. Innerhalb der ersten Wochen nach der Geburt werden vermehrt  $\alpha$ 1- und  $\beta$ -Untereinheiten im Gehirn exprimiert, was die dominierende postnatale GlyR-Heteromerzusammensetzung reflektiert (Grenningloh *et al.*, 1990a; Malosio *et al.*, 1991a). Ihr Vorkommen in Säugern ist im Wesentlichen auf Rückenmark, Hirnstamm und Retina beschränkt (Malosio *et al.*, 1991b; Sato *et al.*, 1991; Greferath *et al.*, 1994), wobei geringere Konzentrationen von Glycinrezeptoren auch beispielsweise im Gyrus Dentatus des Hippocampus vorkommen (Papadopoulos *et al.*, 2007).

#### 1.4.4. Die Glycinrezeptor $\beta$ -Untereinheit

Die Expression von GlyR $\beta$ -Untereinheiten stellt ein zentrales Ereignis in der Reifung von Neuronen des ZNS dar. Die Anwesenheit dieser Untereinheit induziert die Bildung von  $\alpha/\beta$ -Heteromeren. Bedingt durch die Änderung in der Untereinheitenzusammensetzung, ändern sich auch die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften der GlyRs (Takahashi *et al.*, 1992; Grenningloh *et al.*, 1990a; Bormann *et al.*, 1993). Außerdem ändert sich durch den Einbau der GlyR $\beta$ -Untereinheit auch die Verteilung der Rezeptoren in der Zelle. Grund hierfür ist die in der großen cytoplasmatischen Schleife der  $\beta$ -Untereinheit gelegene Bindestelle für das Gerüstprotein Gephyrin (Meyer *et al.*, 1995). Gephyrin ist an der postsynaptischen Membran angereichert, wo es in aggregierter Form vorliegt und vermutlich ein Netzwerk aus hexagonal angeordneten Homomultimeren bildet (Kneussel & Betz, 2000; Sola *et al.*, 2004). Die direkte Interaktion der GlyR $\beta$ -Untereinheit mit dem Gephyrinnetzwerk führt zur Immobilisierung der GlyRs und reichert sie in der postsynaptischen Membran gegenüber inhibitorischen Nervenendigungen an (Meyer *et al.*, 1995; Calamai *et al.*, 2009). Dies gewährleistet die effiziente Weitergabe inhibitorischer Signale über glycinerge Synapsen.

Derzeit gibt es keine GlyR $\beta$ -defiziente Mauslinie, jedoch gibt es einen Inzeststamm von Mäusen mit einer Spontanmutation im Gen der GlyR $\beta$ -Untereinheit. Diese Mäuse weisen eine Insertion eines LINE1-Elements in Intron 5 des GlyR $\beta$ -Gens auf, was zu abnormaler Prozessierung der GlyR $\beta$ -mRNA und somit zur Verringerung der GlyR $\beta$ -Expression führt (Becker *et al.*, 1986, 1992; Kingsmore *et al.*, 1994; Mühlhardt *et al.*, 1994). Der Phänotyp dieser als „spastisch“ bezeichneten Mäuse ist geprägt von erhöhten Reaktionen in Schrecksituationen und episodisch auftretenden Krämpfen ab der zweiten Woche nach der Geburt (Becker, 1990). In Menschen finden sich ähnliche Symptome bei der sogenannten Hyperekplexie. In Hyperekplexie Patienten wurden Mutationen innerhalb der GlyR $\alpha$ 1 und GlyR $\beta$ -Gene gefunden (Rees *et al.*, 2002). Diese Befunde verdeutlichen die essentielle Bedeutung der GlyR $\beta$ -Untereinheit im adulten Säugerhirn für die inhibitorische synaptische Transmission.

#### 1.5. Gephyrin

Gephyrin ist ein peripheres Membranprotein, welches ursprünglich mit GlyRs aus dem Rückenmark von Ratten aufgereinigt wurde. Aufgrund seiner festen Bindung an den GlyR wurde Gephyrin zunächst als weitere, sog. 93 kDa Untereinheit des Affinitäts-gereinigten GlyRs beschrieben (Pfeiffer *et al.*, 1982). Gephyrin bedeckt die Innenseite der postsynaptischen

Membran von inhibitorisch-GABAergen und -glycinerger Synapsen (Kirsch *et al.*, 1993; Bohlhalter *et al.*, 1994; Sassoè-Pognetto *et al.*, 1994). Hier bildet es ein Netzwerk, welches Glycin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bindet, immobilisiert (Sola *et al.*, 2004) und somit eine Anreicherung der Rezeptormoleküle gegenüber inhibitorischen Präsynapsen erreicht, was eine effiziente Weitergabe inhibitorischer Signale begünstigt. Neben seiner Funktion als synaptisches Rezeptorbindeprotein besitzt Gephyrin auch enzymatische Eigenschaften. In peripheren Geweben katalysiert Gephyrin die Adenylierung von Molybdopterin zum Molybdän-Kofaktor (Feng *et al.*, 1998; Stallmeyer *et al.*, 1999; Smolinsky *et al.*, 2008). Der Molybdän-Kofaktor ist ein Bestandteil des Zellmetabolismus und dient als Kofaktor der Sulfid-Oxidase, der Aldehyd-Oxidase und der Xanthin-Oxidoreduktase (Schwarz, 2005).

Die Abwesenheit von Gephyrin in Neuronen führt zu einem massiven Verlust der synaptischen Lokalisation von GlyRs (Kirsch *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1998) sowie  $\alpha$ 2- und  $\gamma$ 2-Untereinheiten enthaltenden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Essrich *et al.*, 1998; Kneussel *et al.*, 1999, 2001). Das Ausschalten (engl. *knockout*; KO) von Gephyrin ist für Mäuse am Tag der Geburt letal (Feng *et al.*, 1998). Neugeborene, reinerbige KO-Mäuse weisen eine überstreckte Körperhaltung auf, was den Symptomen einer Strychninvergiftung ähnelt. Vermutlich führen die eingeschränkte Atmung und die Unfähigkeit zu säugen innerhalb weniger Stunden nach der Geburt zum Tod der Tiere (Feng *et al.*, 1998). Eine Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität von Gephyrin durch das pflanzliche Homolog Cnx1 änderte nichts an der Letalität der Gephyrin-Defizienz (Grosskreuz *et al.*, 2003). Gephyrin enthält eine N-terminale G-Domäne und eine C-terminale E-Domäne, welche durch eine zentrale Linker-Domäne verbunden sind. G- und E-Domäne sind hoch konserviert und weisen starke Homologien zu den bakteriellen Proteinen MogA bzw. MoeA auf (Prior *et al.*, 1992; Stallmeyer *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2000). Durch Untersuchungen der Autoaggregationseigenschaften wurde für die G-Domäne gefunden, dass sie Trimere bildet (Schwarz *et al.*, 2001; Sola *et al.*, 2001), während die E-Domäne dimerisieren kann (Sola *et al.*, 2004). Die Oligomerisierungseigenschaften von Gephyrin sind von essentieller Bedeutung für dessen Verteilung und Funktion an der Synapse. Unterbindet man die Oligomerisierung von Gephyrin durch das Einbringen von Punktmutationen in die G- oder E-Domäne, führt dies zum Verlust postsynaptischer Gephyrin-Anreicherungen (engl. *-cluster*) (Saiyed *et al.*, 2007). Anhand der bekannten Tri- und Dimerisierungseigenschaften der G- und E-Domänen wurde ein Modell zur Struktur von Gephyrin-Clustern vorgeschlagen, in dem Gephyrin-Trimere polymerisieren und so ein zweidimensionales hexagonales Netzwerk bilden, welches an der postsynaptischen Membran angelagert ist (Kneussel & Betz, 2000; Sola *et al.*, 2004).

### 1.5.1. Gephyrin & Glycinrezeptoren

Die synaptische Konzentrierung von GlyRs durch Gephyrin wird über die Bindung der E-Domäne an die große intrazelluläre Schleife zwischen TMD3 und 4 der GlyR $\beta$ -Untereinheit gewährleistet (Meyer *et al.*, 1995). Durch diese Interaktion werden GlyRs vom Gephyrinnetzwerk an der postsynaptischen Membran gehalten und in ihrer Diffusion eingeschränkt (Maas *et al.*, 2009). In Immunfärbungen werden angereichertes Gephyrin sowie assoziierte Rezeptoren daher als kleine Punkte an inhibitorischen Synapsen sichtbar. Der genaue Mechanismus des Auf- und Abbaus multimerer GlyR-Gephyrin-Komplexe an der Synapse ist nicht gänzlich geklärt (Dumoulin *et al.*, 2010). Zellkulturstudien lassen vermuten, dass die Gephyrin-GlyR-Interaktion bereits im Soma stattfindet und Gephyrin-GlyR-Komplexe über Mikrotubuli-abhängige Transportmechanismen an die Plasmamembran transportiert werden könnten (Hanus *et al.*, 2004). Durch Hefe-2-Hybrid-Studien wurde gefunden, dass Gephyrin in der zentralen Linker-Region eine Bindesequenz für das Motorprotein Dlc1/2 enthält (Fuhrmann *et al.*, 2002). Der retrograde Transport von Gephyrin-GlyR-Komplexen aus Dendriten wird demnach durch die direkte Bindung von Gephyrin an das Motorprotein Dlc1/2 und einen damit einhergehenden aktiven Transport entlang von Mikrotubuli (MT) vermittelt (Maas *et al.*, 2006). Der anterograde Transport hingegen ist von der Bindung von Gephyrin an das MT-Motorprotein KIF5 abhängig, welches auch in den dynamischen Transport von Glutamatrezeptoren involviert ist (Setou *et al.*, 2002; Maas *et al.*, 2009). Studien, welche in Neuronenkulturen durchgeführt wurden, zeigten, dass der Transport der Gephyrin-GlyR-Komplexe ein dynamischer Vorgang ist, welcher durch neuronale Aktivität reguliert werden kann. So führt die Applikation des GlyR-Antagonisten Strychnin zu einer Reduktion der Komplex-Mobilität und zu einer Störung des Transports entlang von Neuriten (Maas *et al.*, 2009).

### 1.5.2. Gephyrin & GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

Für GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>Rs) konnte erst vor kurzer Zeit eine direkte Interaktion von Gephyrin mit der GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 2-Untereinheit nachgewiesen werden (Tretter *et al.*, 2008). Ein Transportmechanismus für Gephyrin-GABA<sub>A</sub>R-Komplexe, wie für GlyRs postuliert, ist bislang nicht bekannt, jedoch wurde nachgewiesen, dass Gephyrin auch GABA<sub>A</sub>Rs an Postsynapsen stabilisiert und deren Mobilität in der Membran um den Faktor 3 einschränkt (Thomas *et al.*, 2005). Die Abwesenheit von Gephyrin hingegen führt in Neuronenkulturen zum Verlust von synaptischen GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 2- und  $\gamma$ 2-Clustern. Ein Einfluß des Gephyrin-Verlusts durch *knockdown* auf die Diffusionskinetik von GABA<sub>A</sub>R $\beta$ 2-enthaltenden Rezeptoren konnte nicht

nachgewiesen werden (Jacob *et al.*, 2005). Histologische Studien in Gephyrin-KO-Mäusen zeigten ebenfalls eine Reduktion endogener synaptischer GABA<sub>A</sub>R $\alpha$ 2- und  $\gamma$ 2-Cluster im Rückenmark (Essrich *et al.*, 1998; Kneussel *et al.*, 1999). Im Gegensatz hierzu zeigten immunhistochemische Färbungen der GABA<sub>A</sub>R-Untereinheiten  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 5 im Rückenmark der gleichen Tiere keine Reduktion synaptischer Cluster (Kneussel *et al.*, 2001). Derartige Befunde legen die Vermutung nahe, dass es im Säugerhirn sowohl Gephyrin-abhängige als auch Gephyrin-unabhängige Clustermechanismen für GABA<sub>A</sub>Rs gibt.

### 1.5.3. Regulierung des Gephyrin-Clusterings an inhibitorischen Synapsen

Die essentiellen Funktionen von Gephyrin, wie die Bündelung von GlyRs zu synaptischen Clustern, der Transport oder die Stabilisierung von Rezeptoren an der Synapse, wird auf vielfältige Weise über Gephyrin-Bindeproteine ermöglicht und gesteuert. Das Gephyrin-Bindeprotein Collybistin (Cb) ist ein GEF (*guanine-nucleotideexchange factor*) und wurde über Hefe-2-Hybrid-Studien identifiziert (Kins *et al.*, 2000). Die Koexpression einer konstitutiv aktiven Collybistin-Spleißvariante mit Gephyrin in Zelllinien führt zum Auflösen der durch Überexpression entstehenden intrazellulären Gephyrin-“Blobs“ (Kirsch *et al.*, 1995; Kins *et al.*, 2000). Hierbei wird rekombinantes Gephyrin durch die Anwesenheit von Collybistin in kleineren Aggregaten, den sogenannten Microclustern, an die Zellmembran rekrutiert (Kins *et al.*, 2000). Das Ausschalten des Cb-Gens in Mäusen verhindert die synaptische Gephyrin-Clusterbildung im Hippocampus sowie im Cerebellum und führt zu einem regionalen Verlust von GABA<sub>A</sub>Rs (Papadopoulos *et al.*, 2007).

Ein weiterer interessanter Interaktionspartner von Gephyrin in Neuronen ist PIN1 (*peptidyl-prolyl isomerase NIMA interacting protein 1*) (Lu *et al.*, 1996; Zita *et al.*, 2007). Eine Interaktion von PIN1 mit Gephyrin konnte sowohl in Hirnlysaten als auch in rekombinanten Zellsystemen gezeigt werden (Zita *et al.*, 2007). Frühere Studien legen nahe, dass PIN1 bevorzugt an phosphorylierten Serin- und Threoninresten in prolinreichen Proteinregionen bindet und eine cis/trans-Isomerisierung von Peptidbindungen katalysiert (Ranhanathan *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1998). In Bezug auf Gephyrin wird daher vermutet, dass die Bindung von PIN1 zu einer Konformationsänderung von Gephyrin führt, welche eine Gephyrin-GlyR-Bindung begünstigt. Im Einklang mit dieser Vermutung steht der Befund, dass in Neuronen aus PIN1-KO-Mäusen die Glycinrezeptor-Clusterdichte sowie die Amplituden evozierter inhibitorischer postsynaptischer Ströme reduziert sind. Da die PIN1-Bindung an Proteine generell phosphorylierungsabhängig zu sein scheint, muss Gephyrin, als Voraussetzung einer direkten Interaktion mit PIN1,

phosphoryliert vorliegen (Shen *et al.*, 1998). Hinweise darauf, dass Gephyrin phosphoryliert werden könnte, gibt es aus *in vitro*-Phosphorylierungsstudien, Mutagenesexperimente und massenspektrometrischen Daten-Vorhersagen. (Langosch *et al.*, 1992; Zita *et al.*, 2007; Gnad *et al.*, 2007). Diese legen nahe, dass die Serinreste 188 und 194 phosphoryliert werden können.

## 1.6. Die Säugetier-Retina

Die Wahrnehmung von Lichtreizen geschieht im hinteren Teil des Auges, in einer dünnen, dem Pigmentepitel aufliegenden Nervenzellschicht, der Netzhaut (Retina). Eine Reihe von hochspezialisierten Sinneszellen, die Photorezeptoren wandelt hier eintreffendes Licht in elektrische Signale um. Diese Signale werden in der Retina verarbeitet und durch den optischen Nerv in höhere Hirnregionen projiziert. Während der Embryonalentwicklung bildet sich die Retina aus einer Ausstülpung des Neuralrohrs und ist daher, wie Gehirn und Rückenmark, ein Teil des ZNS.

Die Säugetier-Retina wird seit langem erfolgreich als Modelorgan zur Untersuchung von Nervenzellen verwendet. Grund hierfür ist zum einen der Stellenwert der Lichtwahrnehmung für den Menschen und andere Säugetiere. Ein weiterer Grund für die ausführliche Erforschung der Retina ist die hohe physiologische und strukturelle Homologie ihrer Neurone und Synapsen zu denen im Hirngewebe. Die lokale Signalverarbeitung in der Retina ist sehr komplex. Jedoch ist sie verglichen mit anderen Hirnregionen besser von außen zugänglich. Außerdem sind die beteiligten Zelltypen und auch die Gewebsstruktur sehr gut untersucht, was eine gute Basis für die Untersuchung von Mikroschaltkreisen darstellt. Aus der Retinaforschung erbrachte Erkenntnisse, beispielsweise über den Aufbau von Synapsen, lassen sich oftmals auf die im Hirn vorhandenen Strukturen übertragen und sind somit nicht nur für die Erforschung der Lichtwahrnehmung wertvoll.

### 1.6.1. Zelluläre Architektur der Retina von Mäusen

Die Mausretina ist ein stark strukturiertes Gewebe, welches aus einer Vielzahl morphologisch unterscheidbarer Neurone aufgebaut ist (Masland, 2001a; **Abb. 3**). Querschnitte der ca. 200 µm dicken Retina zeigen eine geschichtete Anordnung von Zellen, wobei sich die Neurone zwischen verschiedenen Schichten funktionell sowie morphologisch stark unterscheiden (Wässle, 2004). Die Umwandlung von Licht in elektrische Signale geschieht in den außen gelegenen Photorezeptorzellen. Diese Signale werden dann über weiter innen liegende Ganglienzellen in

höhere visuelle Zentren des Gehirns weitergeleitet. Durch komplexe synaptische Verschaltungen von Neuronen wird bereits in der Retina eine lokale Verarbeitung der optischen Information geleistet. Dies ist notwendig, da das optische Abbild, das auf die Retina trifft, wichtige Informationen wie Kontrast und Schärfe beinhaltet. Solche Informationen können nur korrekt verwertet werden, wenn die Signale von Zellen an bestimmten Positionen miteinander verglichen und verrechnet werden. Die richtige räumliche Anordnung der Retinazellen ist also essentiell. Da diese räumliche Anordnung im Gehirn nicht gegeben ist, würde eine direkte Projektion der primären Lichtsignale von der Retina bis ins Gehirn, ohne vorherige Verarbeitung, einen enormen Informationsverlust zur Folge haben.

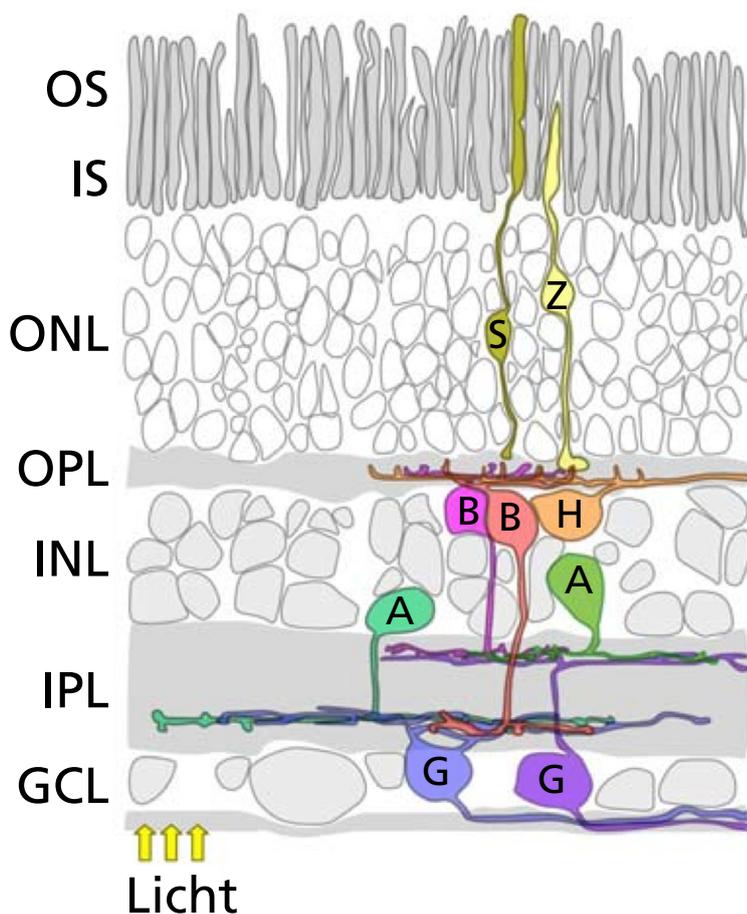


Abb. 3: Zellulärer Aufbau der Säugetierretina. OS, äußere Photorezeptorsegmentschicht; IS, innere Photorezeptorsegmentschicht; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht; S, Stäbchen-Photorezeptoren; Z, Zapfen-Photorezeptoren; B, Bipolarzelle; H, Horizontalzelle; A, Amakrinzelle; G, Ganglienzelle (Modifiziert nach Euler *et al.*, 2008)

Die Licht-absorbierenden Pigmente liegen in den äußeren Segmenten (OS; engl. *outer segment*) der Photorezeptorzellen. Der Zellbereich, der den Großteil der Mitochondrien enthält, wird als inneres Segment (IS; engl. *inner segment*) der Photorezeptoren bezeichnet. Beide Segmente befinden sich, relativ zu den in der äußeren Körnerschicht (ONL; engl. *outer nuclear*

layer) gelegenen Neuronzellkernen, auf der dem Licht abgewandten Seite und stehen in Kontakt mit dem Pigmentepithel. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL; engl. *outer plexiform layer*) befinden sich die synaptischen Verschaltungen von Photorezeptoren mit Horizontal- und Bipolarzellen. Deren Zellkörper, wie auch die von Amakrinzellen, liegen wiederum in der inneren Körnerschicht (INL; engl. *inner nuclear layer*). Die Innervierung von den in den Cortex projizierenden Ganglienzellen durch Amakrin- und Bipolarzellen ist auf die innere plexiforme Schicht (IPL; engl. *inner plexiform layer*) beschränkt. Die IPL kann in fünf horizontal verlaufende Sublamina (S1-S5) unterteilt werden, wobei S1 außen, an der Grenzschicht zwischen IPL und INL, und S5 innen, an der Grenzschicht zwischen IPL und Ganglienzellschicht, liegt. In der Ganglienzellschicht (GCL; engl. *ganglion cell layer*) befinden sich hauptsächlich Ganglienzellen und vereinzelt auch Amakrinzellkörper. Von hier aus lagern sich die Axone der Ganglienzellen in einer Nervenfaserschicht zusammen und bündeln sich schließlich als optischer Nerv, welcher die Informationen an das Gehirn weitergibt.

### 1.6.2. Glycinerge Transmission in der Retina

Wie in Gehirn und Rückenmark sind Glycin und GABA auch in der Retina die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter. Erste Hinweise auf die Anwesenheit glycinерger Zellen in der Retina ergaben Autoradiographiestudien mit tritiiertem Glycin (Ehinger & Falck, 1971). Hier konnte eine deutliche Aufnahme von Glycin in Amakrinzellen beobachtet werden, während Bipolarzellen nur schwach radioaktiv markiert wurden. Neuere Untersuchungen mittels Antikörperfärbungen von Glycin und dem Glycintransporter1 (GlyT1) bestätigen diese Beobachtungen (Abb. 4; Pow, 1998; Haverkamp & Wässle, 2000; Pow & Hendrickson, 2000). Amakrinzellkörper und Dendriten werden durch Glycin-spezifische Antikörper deutlich gefärbt, während Bipolarzellen nur schwach markiert werden. Färbungen des GlyT1 (Pow, 1998), welches in der Retina als Markerprotein für glycinerge Zellen etabliert ist, zeigen ein starke perisomatische Färbung von Amakrinzellen in der INL sowie auch der Dendriten in der IPL (Haverkamp & Wässle, 2000). Zusammengenommen weisen diese Untersuchungen darauf hin, dass Bipolarzellen, trotz nachweisbarer Mengen von Glycin in ihren Zellkörpern, rein glutamaterge Signalübertragung vermitteln, und dass Glycin über Connexin-Verbindungen aus glycinergen Amakrinzellen in Bipolarzellen diffundiert (Vaney *et al.*, 1998; Pow & Hendrickson, 2000). Etwa die Hälfte aller Amakrinzellen nutzen Glycin als Neurotransmitter an ihren Synapsen. Diese Zellen vermitteln den Großteil der glycinergen Signalübertragung in der Retina. Ihre synaptischen Ausgänge kontaktieren Bipolar-, Ganglien- und andere Amakrinzellen in der

IPL, jedoch gibt es auch vereinzelt interplexiforme Kontakte zu Biolarzellen in der OPL (Jusuf *et al.*, 2005; Sassoé-Pognetto *et al.*, 1994; Kolb & West, 1977).

### 1.6.3. Verteilung von GlyRs in der Retina

Die Verteilung der  $\alpha$ -Untereinheiten von GlyRs in der Mausretina wurde immunhistochemisch eingehend untersucht (Sassoé-Pognetto *et al.*, 1994; Haverkamp *et al.*, 2003, 2004; Heinze *et al.*, 2007). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass GlyR $\alpha$ -Untereinheiten im Wesentlichen in der IPL vorkommen. Lediglich GlyR $\alpha$ 1-Untereinheiten wurden vereinzelt auch auf Bipolarzellen in der OPL gefunden (Sassoé-Pognetto *et al.*, 1994).

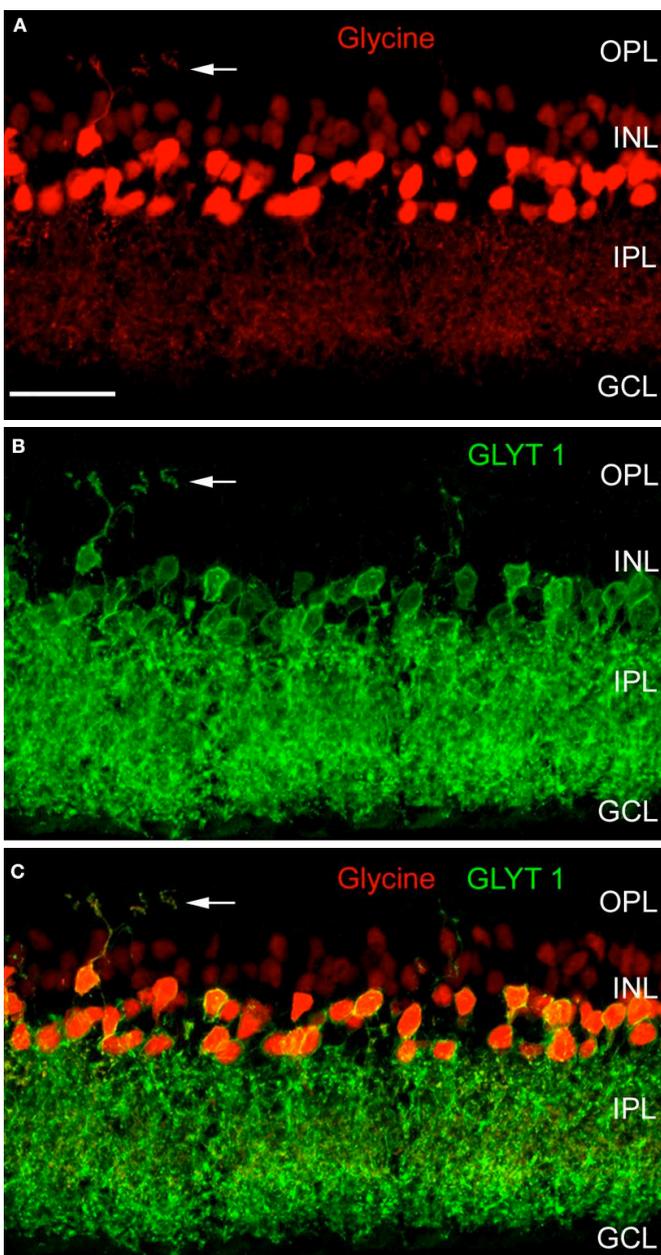


Abb. 4: Glycinerge Amakrinzellen in der Mausretina. A-C: Ein Vertikalschnitt durch die Retina wurde einer Immundoppelfärbung unterzogen, wobei Glycinspezifische Antikörper im roten Kanal (A), GlyT1-spezifische Antikörper im grünen Kanal (B) gezeigt sind. Starke Glycinfärbung ist in Zellkörpern von Amakrinzellen in der inneren INL und deren Dendriten in der IPL zu sehen. Die Zellkörper von Bipolarzellen in der äußeren INL sind nur schwach gefärbt. Die Färbung von GlyT1 zeigt starke Signale am Soma und an Dendriten von Amakrinzellen. Die Überlagerung beider Kanäle verdeutlicht, dass nur Amakrinzellen positiv für Glycin und GlyT1 sind (C). Bipolarzellen enthalten nur wenig Glycin. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m. (Modifiziert nach Haverkamp & Wässle, 2000)

Der größte Teil von GlyR $\alpha$ 1 ist jedoch auf Zellen in den oberen Strata (S1, S2) der IPL lokalisiert. Diese Synapsen stellen vermutlich Kontakte zwischen AII Amakrinzellen und OFF-Zapfenbipolarzellen dar. In den inneren Strata verteilte kleinere immunreaktive Punkte repräsentieren hingegen Synapsen auf Ganglienzelldendriten und Axonen von Stäbchenbipolarzellen (Ivanova *et al.*, 2006; Majumdar *et al.*, 2007). GlyR $\alpha$ 2 ist die am weitesten verbreitete GlyR $\alpha$ -Untereinheit in der Retina und wurde an Synapsen über die gesamte IPL hinweg gefunden (Haverkamp *et al.*, 2004). Die Verteilung von GlyR $\alpha$ 2 über die Sublamina zeigt sich relativ homogen. Immunfärbungen von GlyR $\alpha$ 3 zeigen ebenfalls eine breite Verteilung über die gesamte IPL, wobei die immunpositiven Punkte entlang der einzelnen Strata der IPL (S1-5) angereichert sind (Haverkamp *et al.*, 2003). GlyR $\alpha$ 4, das im Menschen nur als Pseudogen vorkommt, ist ebenfalls über die gesamte IPL verteilt, wobei ein Großteil der Immunreaktivität als Band aus Punkten hoher Dichte zwischen Stratum 3 und 4 beschrieben wurde (Heinze *et al.*, 2007). Bei diesen Synapsen handelt es sich vermutlich um glycinerge Eingänge an Dendriten von cholinergen Amakrinzellen in der ON-Schicht der IPL. Anhand der Morphologie und Lokalisation dieses Zelltyps nennt man diese Neurone auch ON-*Starburst*-Amakrinzellen. Der Nachweis von GlyR $\beta$  in der Retina steht bislang noch aus. Derzeit geht man davon aus, dass alle synaptischen GlyR-Pentamere aus jeweils zwei Kopien von GlyR $\alpha$  und drei Kopien von GlyR $\beta$  bestehen (siehe **Abb. 2**). Die Bindung von Gephyrin an GlyR $\beta$  ist für die Rezeptorlokalisierung essentiell. Daher wird vermutet, dass sämtliche synaptischen GlyRs in der Säugetierretina auch GlyR $\beta$  beinhalten.

## **1.7. Ziele dieser Arbeit**

### **1.7.1. Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit und Immunchemische Untersuchungen zu ihrer Verteilung**

Die Bindung von Gephyrin an GlyRs wird durch eine direkte Interaktion zwischen der C-terminalen E-Domäne von Gephyrin und der GlyR $\beta$ -Untereinheit gewährleistet. Somit ist die GlyR $\beta$ -Untereinheit nicht nur ein zentraler Bestandteil heteromerer GlyRs im Säugerhirn, sondern auch von essentieller Bedeutung für die Bündelung von GlyRs an der Synapse. Erkenntnisse über das Vorkommen von GlyR $\beta$ -enthaltenden Rezeptorkomplexen im Gehirn stammen bislang lediglich von Daten aus elektrophysiologischen Experimenten sowie in situ Hybridisierungsstudien zur Verteilung von GlyR $\beta$ -mRNA in Hirnschnitten. Aufgrund des

Fehlens eines spezifischen Antikörpers stehen zur Zeit keine immunchemischen Daten über die Lokalisation dieser essentiellen Untereinheit im Gehirn oder in Zellkulturen zur Verfügung. Daher wurden in dieser Arbeit ein monoklonaler Antikörper gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit hergestellt und Immunfärbungen an Hirnschnitten und Neuronenkulturen durchgeführt. Unter anderem wurde durch derartige Färbungen auch untersucht, inwiefern alle GlyR $\alpha$ -Untereinheiten im adulten Säuger mit GlyR $\beta$  an Synapsen kolokalisieren. Frühere Studien lassen vermuten, dass im adulten Maus-ZNS alle synaptischen GlyRs als Heteropentamere mit einer Stöchiometrie von 2 $\alpha$ :3 $\beta$  vorliegen. Daher wird davon ausgegangen, dass alle synaptischen GlyR  $\alpha$ -Untereinheiten mit GlyR $\beta$  kolokalisieren. Diese Hypothese wurde durch direkte Färbung endogener GlyRs im Mausgehirn und -retina untersucht.

### **1.7.2. Untersuchungen zur Regulation der Gephyrin-Clusterbildung durch Phosphorylierung**

Hinweise darauf, dass Gephyrin an Serin-/Threoninresten phosphoryliert wird, wurden bereits vor etwa zwei Jahrzehnten erbracht (Langosch *et al.*, 1990). Dennoch stehen endgültige Beweise hierfür noch aus. Neue Studien zur pharmakologischen Beeinflussung der Gephyrin-Gerüstbildung führten zur Identifikation von PP1 und PP2A (Proteinphosphatase 1 und 2A) als mögliche Gephyrin-Bindungspartner (Bausen *et al.*, 2010). Die pharmakologische Inhibition dieser Phosphatasen führte nachweislich zu einer Reduktion postsynaptischer Gephyrin-Cluster in hippocampalen Neuronen. Die gefundenen Interaktionen dieser Enzyme mit Gephyrin führen zu der Annahme, dass sie auch direkten katalytischen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Gephyrin nehmen und somit die beobachteten Veränderungen im Clustering von Gephyrin auslösen könnten. Vor dem Hintergrund der kürzlich vorgeschlagenen Regulierung der Gephyrin-GlyR-Bindung durch eine phosphorylierungsabhängige PIN1-Interaktion (Zita *et al.*, 2007) ist die Idee der Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von Gephyrin durch Proteinphosphatasen sehr interessant. Daher wurde durch Mutagenesestudien untersucht, inwiefern Phosphorylierungen einen regulierenden Einfluss auf die Lokalisation und Rezeptorbindungseigenschaften von Gephyrin ausüben. Hierzu wurden verschiedene Gephyrinmutanten in primären hippocampalen Neuronenkulturen exprimiert und die Verteilung und Größe von Gephyrin- und Rezeptor-Clustern qualitativ und quantitativ analysiert.

### 1.7.3. Vergleichende Analyse der Genexpression im Gehirn von WT- und Gephyrin-KO-Mäusen

Gephyrin ist das einzige bekannte Protein inhibitorischer Synapsen, für das eine zentrale Rolle bei der snaptischen Lokalisation von GlyRs und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren nachgewiesen ist. Wie das Clustering dieser Rezeptoren durch Gephyrin reguliert wird, ist bislang nicht geklärt. Bislang wurden neben den Gephyrin-bindenden inhibitorischen Rezeptoren auch Dlc1/2, RAFT-1 (*rapamycin and FKBP target-1*), Profilin, Collybistin1/2, Mena/VASP (mammalian enabled/vasodilator stimulated phosphoprotein) PP1/2A (*protein phosphatase1/2A*) und PIN1 (*peptidyl-prolyl isomerase NIMA interacting protein 1*) als Gephyrin-Bindeproteine gefunden (Mammoto *et al.*, 1998; Sabatini *et al.*, 1999; Kins *et al.*, 2000; Fuhrmann *et al.*, 2002; Giesemann *et al.*, 2003; Zita *et al.*, 2007; Bausen *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Bindung, dem Transport und der Anreicherung von GlyRs und GABA<sub>A</sub>Rs an der Synapse spielen. Deshalb wurde durch vergleichende quantitative Analyse der Genexpression im Vorderhirn von Gephyrin-defizienten Mäusen versucht, Hinweise auf bislang unbekannte Gephyrin-assoziierte bzw. regulatorische Genprodukte und Signalwege zu erhalten, welche die Gephyrinnetzwerk-Bildung oder das Rezeptor-Clustering beeinflussen.

# 2. Material & Methoden

## 2.1. Materialien

### 2.1.1. Chemikalien

#### Chemikalien

Aceton  
Acrylamid  
Agarose  
Aprotinin  
APS  
AraC  
BactoAgar  
Benzamidin  
Benzethoniumchlorid  
BES  
Brilliant Blau G250  
Bromphenolblau  
BSA  
Braun Reinstwasser  
B27  
 $\beta$ -Mercaptoethanol  
DAPI  
DMEM  
DMSO  
DTT  
EDTA  
EGTA  
 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$   
Entwickler  
HAc  
Ethanol  
Fixierer  
Fötale Kälberserum  
Glucose  
Glutamin  
Glutathion-Sepharose  
Glycerol  
Glycin  
Hefeextrakt  
HEPES  
Iodixanol

#### Lieferant

Carl-Roth, Karlsruhe  
Bio-Rad, München  
Lonza AG, Köln  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Merck, Darmstadt  
Merck, Darmstadt  
BD Biosciences, Heidelberg  
Amersham Biosciences, Freiburg  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Invitrogen, Karlsruhe  
Serva, Heidelberg  
Serva, Heidelberg  
Pan Biotech GmbH, Aidenbach  
Braun Biotech International GmbH, Melsungen  
Invitrogen, Karlsruhe  
Fluka, Buchs, Schweiz  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Invitrogen, Karlsruhe  
Fluka, Buchs, Schweiz  
Carl-Roth, Karlsruhe  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Riedel-de Haen, Seelze  
AGFA, Köln  
Carl-Roth, Karlsruhe  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
AGFA, Köln  
Pan Biotech GmbH, Aidenbach  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Invitrogen, Karlsruhe  
Amersham Biosciences, Freiburg  
Carl-Roth, Karlsruhe  
Applichem, Darmstadt  
Applichem, Darmstadt  
Applichem, Darmstadt  
GE-Healthcare, München

Isopropanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Carl-Roth, Karlsruhe
KCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 3H <sub>2</sub> O	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Lipofectamine2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Granovita, Heimertingen
MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MgCl <sub>2</sub> × 7H <sub>2</sub> O	Riedel-de Haen, Seelze
NaCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
tri-Natriumcitrat × 2H <sub>2</sub> O	Carl-Roth, Karlsruhe
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	Riedel-de Haen, Seelze
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Neurobasalmedium	Invitrogen, Karlsruhe
NDS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NGS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NP40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Papain	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin / Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Peptide	Metabion, Martinsried
Pepton	Carl-Roth, Karlsruhe
Percoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenylmethansulfonylfluorid	Carl-Roth, Karlsruhe
Phosphatidylcholin	Carl-Roth, Karlsruhe
Polyaquamount	Polysciences Europe, Eppenheim
Poly-DL-Ornithin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PEG 3000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Saccharose	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
SDS	Carl-Roth, Karlsruhe
SeeBlue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe
SmartLadder 1kb	Eurogentec, Köln
SmartLadder 100bp	Eurogentec, Köln
TEMED	Fluka, Buchs, Schweiz
Tissue-Tek	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Tris	Applichem, Darmstadt
Triton X-100	Applichem, Darmstadt
TRIZOL®	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Roche Applied Science, Mannheim
Trypsin/EDTA -Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Applichem, Darmstadt
Tween®20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Urea	Applichem, Darmstadt

## 2.1.2. Puffer und Zellkulturmedien

### 2.1.2.1. Proteinchemie

CBB-Enfärber1	50%	1 l	Methanol
	7,5%	150 ml	HAc
	5%	100 g	Glycerin
ad 2 l mit H <sub>2</sub> O			
CBB-Enfärber2	5%	100 ml	Methanol
	7,5%	150 ml	HAc
	5%	100 g	Glycerin
ad 2 l mit H <sub>2</sub> O			
CBB-Färbelösung	50%	250 ml	Methanol
	7,5%	18,75 ml	HAc
	0,1%	0,2 g	CBB G250
ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O			
EDTA-Lösung	250 mM	18,27 g	EDTA
ad 250 ml mit GlyR-Puffer B, mit KOH auf pH 7,4 einstellen.			
EGTA-Lösung	250 mM	23,77 g	EGTA
ad 250 ml mit GlyR-Puffer B, mit KOH auf pH 7,4 einstellen.			
GlyR-Puffer A		17,12 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 3 H <sub>2</sub> O
		3,47 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 4 l mit H <sub>2</sub> O, mit HCl auf pH 7,4 einstellen (25 mM KP <sub>i</sub> ).			
GlyR-Puffer A'	40%	2 l	GlyR-Puffer A
ad 5 l mit H <sub>2</sub> O (10 mM KP <sub>i</sub> ).			
GlyR-Puffer B	200 mM	14,91 g	KCl
ad 1 l mit GlyR-Puffer A.			
GlyR-Puffer C	1 M	74,55 g	KCl
	1%	10 g	Triton X-100
ad 1 l mit GlyR-Puffer A.			
GlyR-Puffer D	0,0018%	453 mg	Phosphatidylcholin
	0,02%	5 ml	EDTA-Lösung (250 mM)
	0,02%	5 ml	EGTA-Lösung (250 mM)
	0,02%	5 ml	50 × Stabilisatoren-Mix
ad 250 ml mit GlyR-Puffer C.			

GlyR-Puffer E ad 1 l mit GlyR-Puffer D.	200 mM	15,01 g	Glycin
GlyR-Puffer F ad 250 ml mit GlyR-Puffer E.	6 M	90,09 g	Urea
PBS-MK ad 250 ml mit PBS (aus 2.1.2.4.).	1 mM	51 mg	MgCl <sub>2</sub> × 7 H <sub>2</sub> O
PMSF-Lösung ad 20 ml mit DMSO und Sterilfiltrieren.	1 M	3,48 g	Phenylmethansulfonylfluorid
Saccharose-Puffer ad 1 l mit Puffer A', mit HCl auf pH 8,0 einstellen und Sterilfiltrieren.	0,6 M	205,38 g	Saccharose
8× Sammelgelpuffer ad 1 l mit H <sub>2</sub> O, mit HCl auf pH 6,8 einstellen	1,0 M 0,8 %	121,14 g 8 g	Tris SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer ad 1 l mit H <sub>2</sub> O	25 mM 0,2 M 0,1 %	3 g 14,4 g 1 g	Tris Glycin SDS
5× SDS-Probenpuffer ad 15 ml mit 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8. Vor dem Gebrauch 200 mM DTT oder β-Mercaptoethanol zugeben.	25 % 5 % 0,01 %	3 g 0,6 g 0,15 g	Glycerin SDS Bromphenolblau
Soulbilisierungspuffer	5% 5% 5% 5% 1,35 M 0,000625% 75%	3 ml 3 ml 3 ml 3 ml 2,5 ml 15 µl 45 ml	50 × Stabilisatoren-Mix EDTA-Lösung (250 mM) EGTA-Lösung (250 mM) Puffer B KCl (3,2 M Stock) PMSF-Lösung 50 × Stabilisatoren-Mix
Stabilisatoren-Mix (für 10 l) ad 8 ml EDTA-Lösung.	2,5 U 0,11 M	55 µl 390 mg	Aprotinin Benzethoniumchlorid

50 × Stabilisatoren-Mix	5,6 mM	74 mg	Benzethoniumchlorid
	58 mM	344 mg	Benzamidin
	10 U	110 µl	Aprotinin
	260 mM	1,5 g	DTT

ad 37,5 ml mit GlyR-Puffer B.

TBS	137 mM	8,0 g	NaCl
	10 mM	1,21 g	Tris

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O, pH mit HCl auf 7,4 einstellen.

TBS-T	0,2 %	2 ml	Triton X-100
	137 mM	8,0 g	NaCl
	10 mM	1,21 g	Tris

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O, pH mit HCl auf 7,4 einstellen

TBS-T/T	0,2 %	0,2 ml	Triton X-100
	0,05 %	0,5 ml	Tween <sup>®</sup> 20
	137 mM	8,0 g	NaCl
	10 mM	1,21 g	Tris

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O, pH mit HCl auf 7,4 einstellen.

Transferpuffer	25 mM	3 g	Tris
	0,2 M	14,4 g	Glycin
	0,1 %	1 g	SDS
	20%	200 ml	Methanol

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O

4× Trenngelpuffer	1,5 M	181,71 g	Tris
	0,4 %	4 g	SDS

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O, mit HCl auf pH 8,8 einstellen.

TXK-Lösung	10%	5 g	Triton X-100
	2,7 M	10,06 g	KCl

ad 50 ml mit Puffer A und Sterilfiltrieren.

### 2.1.2.2. Molekularbiologie

DNA-Ladepuffer	40 %	20 g	Saccharose
	0,25 %	0,125 g	Bromphenolblau

ad 50 ml mit sterilem H<sub>2</sub>O

LB-Agar-Platten	0,5 %	5 g	Hefeextrakt
	1 %	10 g	Trypton
	1 %	10 g	NaCl
	1,5 %	15 g	Agar

Nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin zugeben.

LB-Medium	0,5 %	5 g	Hefeextrakt
	1 %	10 g	Pepton
	1 %	10 g	NaCl

50 × TAE-Puffer	2 M	242 g	Tris
	5,7%	57 ml	HAc (Eisessig)
	64 mM	18,6 g	EDTA

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O. pH 8,0 überprüfen und ggf. einstellen.

TE-Puffer	10 mM	1,21 g	Tris
	1 mM	0,29 g	EDTA

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O, mit HCl ad pH 8,0

### 2.1.2.3. Zellkultur

2×BBS	50 mM	2,67 g	BES
	280 mM	4,09 g	NaCl

ad 250 ml mit 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, mit HCl auf exakt pH 6,95 einstellen.

DMEM <sup>+++</sup>	10%	10%	Fötale Kälberserum
	50 U	5 ml	Penicillin / Streptomycin-Stock
	2 mM	5 ml	Glutamin-Stock (200 mM)

auf 500 ml DMEM

DMEM <sup>++++</sup>	10%	50 ml	Fötale Kälberserum
	50 U	5 ml	Penicillin / Streptomycin-Stock
	2 mM	5 ml	Glutamin-Stock (200 mM)
	5 µg / ml	100 µl	Na <sup>+</sup> -Pyruvat-Stock (25 mg/ml)

auf 500 ml DMEM

15% Iodixanol-Lösung	15%	12 ml	Iodixanol-Stock (54%)
	1 M	21,6 ml	NaCl (2 M)
	22%	9,6 ml	PBS-MK

25% Iodixanol-Lösung	25%	20 ml	Iodixanol-Stock (54%)
	1 M	21,6 ml	NaCl (2 M)
	54%	9,6 ml	PBS-MK

40% Iodixanol-Lösung	40%	32 ml	Iodixanol (54% Stock)
	1 M	21,6 ml	NaCl (2 M)
	26%	9,6 ml	PBS-MK

MEM <sup>+++</sup>	10%	10%	Fötale Kälberserum
	50 U	5 ml	Penicillin / Streptomycin-Stock
	2 mM	5 ml	Glutamin-Stock (200 mM)
auf 500 ml MEM			
Neurobasalmedium <sup>++++</sup>	50 U	5 ml	Penicillin / Streptomycin-Stock
	2 mM	5 ml	Glutamin-Stock (200 mM)
	5 µg / ml	100 µl	Na <sup>+</sup> - Pyruvat-Stock (25 mg/ml)
	2%	2 ml	B27
auf 100 ml Neurobasal-Medium			
Papain-Lösung	10 mM	5 ml	Glucose/PBS-Stock (10 mM)
	30 U	3 mg	Papain
	100 kU	25 µl	DNAse1-Stock (2 mg / ml)
Sterilfiltrieren und vor Gebrauch auf 37°C erwärmen.			
100 × Polyornithin-Stock in 20 ml H <sub>2</sub> O lösen.	1,5 µg/ml	300 mg	Poly-DL-Ornithin-Hydrobromid

#### 2.1.2.4. Immunfärbungen

Antikörperlösung	1%	0,2 g	BSA
	3%	600 µl	NGS
	0,5%	2 ml	Triton X-100 (5% in PBS)
ad 20 ml mit PBS			
Natriumcitrat-Puffer	10 mM	2,94 g	tri-Natriumcitrat × 2 H <sub>2</sub> O
mit 1 l H <sub>2</sub> O lösen, mit HCl auf pH 8,0 einstellen			
PB (0,2 M)	0,162 M	43,42 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O
	0,035 M	5,24 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O
ad 1 l mit H <sub>2</sub> O, pH 7,4, nicht einstellen.			
PB (0,1 M)	0,1 M	500 ml	PB (0,2 M)
ad 1 l mit H <sub>2</sub> O, pH 7,4, nicht einstellen.			
PBS	137 mM	8,0 g	NaCl
	2,68 mM	0,2 g	KCl
	10 mM	2,7 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O
	1,76 mM	0,24 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1 l mit H <sub>2</sub> O, pH 7,4, nicht einstellen.			

Präinkubationslösung	1%	0,2 g	BSA
	10%	2 ml	NGS
	0,5%	2 ml	Triton X-100 (5% in PBS)

ad 20 ml mit PBS

Retina-Blocklösung	1%	0,2 g	BSA
	3%	600 µl	NDS
	0,5%	2 ml	Triton X-100 (5% in PB)

ad 20 ml mit 0,1 M PB

### 2.1.3. Kits

#### Kit

Brilliant® II SYBR® Green qPCR Master-Mix  
 Western Dura ECL-Kit  
 DC Protein-Test  
 GenElute-Gelextraktionskit  
 HiSpeed-Plasmid-Maxi-Isolierungs-  
 kit  
 HiTrap-Benzaminide-FF-Kit  
 Plasmid-Mini-Isolierungs-  
 kit  
 Plasmid-Midi-Isolierungs-  
 kit  
 Plasmid-Maxi-Isolierungs-  
 kit  
 Quick Change-Mutagenesekit  
 Silver Stain Plus-Kit  
 SuperscriptScriptIII® FirstStrand-Synthesekit  
 TOPO-TA-Klonierungs-  
 kit  
 Transcriptor High Fidelity cDNA-Synthesekit

#### Lieferant

Stratagene, Amsterdam, Niederlande  
 Thermo-Fischer Scientific, Rockford, USA  
 Bio-Rad, München  
 Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
 Qiagen, Hilden  
 Amersham Biosciences, Freiburg  
 Qiagen, Hilden  
 Qiagen, Hilden  
 Qiagen, Hilden  
 Stratagene, Amsterdam, Niederlande  
 Bio-Rad, München  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Roche Applied Science, Mannheim

### 2.1.4. Primärantikörper

Bezeichnung	Antigen	Referenz	Quelle
mAb2b	AS 1 - 10 von GlyR $\alpha$ 1 (Ratte)	Pfeiffer <i>et al.</i> , 1984	SynapticSystems, Göttingen
mAb4a	AS 96 - 105 von GlyR $\alpha$ 1 (Ratte)	Pfeiffer <i>et al.</i> , 1984	SynapticSystems, Göttingen
mAb7	N-term. von Gephyrin (Ratte)	Pfeiffer <i>et al.</i> , 1984	SynapticSystems, Göttingen
mBassoon	Bassoon (Ratte)	Ohtsuka <i>et al.</i> , 2002	Abcam, Cambridge, UK
rbVIAAT	AS 75 - 87 von VIAAT (Ratte)	Martens <i>et al.</i> , 2008	SynapticSystems, Göttingen

rbGephyrin	AS 294 - 736 von Gephyrin (Ratte)	[nicht publiziert]	SynapticSystems, Göttingen
rbGlyR $\alpha$ 1	AS 362 - 422 von GlyR $\alpha$ 1 (Ratte)	[nicht publiziert]	SynapticSystems, Göttingen
rbGlyR $\alpha$ 2	[nicht publiziert]	[nicht publiziert]	SynapticSystems, Göttingen
rbGlyR $\alpha$ 3	[nicht publiziert]	[nicht publiziert]	SynapticSystems, Göttingen
rbGlyR $\alpha$ 4	C-term. von GlyR $\alpha$ 4 (Maus)	Heinze <i>et al.</i> , 2007	Millipore, Schwalbach
gtGlyR $\alpha$ 2	N-term. von GlyR $\alpha$ 2 (Human)	Haverkamp <i>et al.</i> , 2004	Santa Cruz Biotech, USA
gtGlyR $\alpha$ 3	C-term. von GlyR $\alpha$ 3 (Human)	Majumdar <i>et al.</i> , 2007	Santa Cruz Biotech, USA
gtGlyR $\beta$	C-term. von GlyR $\beta$ (Human)	[nicht publiziert]	Santa Cruz Biotech, USA
gtGABAAR $\gamma$ 2	[nicht publiziert]	Benke <i>et al.</i> , 1994	Jean-Marc Fritschy, Paris
rbFLAG	N-DYKDDDDK-C	Li <i>et al.</i> , 2008	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
mHA	N-YPYDVPDYA-C	Carey <i>et al.</i> , 2010	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
rbMyc	N-EQKLISEENL-C	Evan <i>et al.</i> , 1985	Santa Cruz Biotech, USA

## 2.1.5. Sekundärantikörper

### Antikörper

Alexa488 Ziege gegen Maus

Alexa488 Ziege gegen Kaninchen

Alexa546 Esel gegen Maus

Alexa546 Esel gegen Kaninchen

Alexa633 Ziege gegen Maus

Alexa633 Ziege gegen Kaninchen

HRP Ziege gegen GST

HRP Ziege gegen Maus

HRP Ziege gegen Kaninchen

HRP Esel gegen Ziege

HRP Rind gegen Ziege

### Lieferant

Invitrogen, Karlsruhe

Invitrogen, Karlsruhe

Dianova, Hamburg

Dianova, Hamburg

Invitrogen, Karlsruhe

Invitrogen, Karlsruhe

GE-Healthcare, München

Dianova, Hamburg

Dianova, Hamburg

Dianova, Hamburg

The Jackson Laboratory, Sacramento, USA

## 2.1.6. Plasmide

### Bezeichnung

pcDNA3.1(+)

pGEX-RB

### Quelle

Invitrogen, Karlsruhe

Brundiers *et al.*, 1999

pGEX-RB-GlyR $\beta$ <sub>336-455</sub>	Dr. Ingo Paarmann, Frankfurt
pGEX-RB-GlyR $\beta$ <sub>351-455</sub>	Dr. Ingo Paarmann, Frankfurt
pGEX-RB-GlyR $\beta$ <sub>378-426</sub>	Dr. Ingo Paarmann, Frankfurt
pGEX-RB-GlyR $\beta$ <sub>336-355</sub>	<i>Felix Weltzien, in dieser Arbeit</i>
pGEX-RB-GlyR $\beta$ <sub>336-370</sub>	<i>Felix Weltzien, in dieser Arbeit</i>
pCIS2	Gorman <i>et al.</i> 1989
pCIS2-huGlyR $\alpha$ 1	Grenningloh <i>et al.</i> , 1990
pSTP19-huGlyR $\alpha$ 2	Grenningloh <i>et al.</i> , 1990
pCIS2rGlyR $\alpha$ 3L	Bormann <i>et al.</i> , 1993
pCIS2rGlyR $\beta$	Dr. Bodo Laube, Frankfurt
pTRACER-mGlyR $\alpha$ 4	Harvey <i>et al.</i> , 2000
pEGFP-C2-Gephyrin	Fuhrmann <i>et al.</i> , 2002
mRFP-Gephyrin	Maas <i>et al.</i> , 2006
pBSK-Gephyrin	Saiyed <i>et al.</i> , 2007
pEGFP-Gephyrin-shortnew	Saiyed <i>et al.</i> , 2007
pEGFP-GephyrinS188A/S194A	<i>Felix Weltzien, in dieser Arbeit</i>
pEGFP-GephyrinS188E/S194E	<i>Felix Weltzien, in dieser Arbeit</i>
pRK5-GFP-GlyR $\beta$	Maas <i>et al.</i> , 2006
pcDNA3-myc-Frabin	Obaishi <i>et al.</i> , 1998
pcDNA3-myc-Dlc-1	Fuhrmann <i>et al.</i> , 2002
pFLAG-EFA6	Koo <i>et al.</i> , 2007
pEGFP-GlyR $\beta$ loop	<i>Felix Weltzien, in dieser Arbeit</i>
pEGFP-C2	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pDP1	Dr. Jürgen Kleinschmidt, Heidelberg
pDP2	Dr. Jürgen Kleinschmidt, Heidelberg
pAAV-hrGFP-Gephyrin	Dr. Bertram Schmitt, Frankfurt
pAAV-hrGFP-GephyrinAA	Dr. Bertram Schmitt, Frankfurt
pAAV-hrGFP-GephyrinEE	Dr. Bertram Schmitt, Frankfurt

### 2.1.7. Oligonukleotide

Genotypisierung von Gephyrin-KO-Mäusen - WT-Fragment

R3: 5'-AGC TGT GAC CTG CAG TCA ATG CTC C-3'

Genotypisierung von Gephyrin-KO-Mäusen - Neomycin-Fragment

F3: 5'-GGG CCA GCT CAT TCC TCC CAC TC-3'

Genotypisierung von Gephyrin-KO-Mäusen - Reverse-Primer

F1: 5'-CAA ACC TAC ACA AAA TAG AGG TGG C-3'

Umklonierung von GlyR $\beta_{336-455}$  aus pGEX-RB in pEGFP-C1 (EcoRI, BamHI)

GBL120FW: 5'-AGC TTC GAA TTC CAA AAG GGT TGA AGC-3'

GBL120RE: 5'-TCC GGT GGA TCC TCA TCT TGC ATA GAG-3'

Generierung von GlyR $\beta_{336-370}$

FLX#1: 5'-CGG GAT CCT CAA GGG GTC CCC GTG CCG TTC-3'

Generierung von GlyR $\beta_{336-355}$

FLX#2: 5'-CGG GAT CCT CAA CCT TTC CCA TCT GCT TGC TC-3'

Reverse-Primer zur Generierung verkürzter GlyR $\beta$  Konstrukte

FLX#3: 5'-GCT GAC AAG CAC AAC ATG TTG GGT G-3'

Gephyrin-Punktmutation an Aminosäure 188 von S zu A

GephS188A-FW: 5'-T TGA AGAT TTA CCT GCC CCA CCA CCT-3'

GephS188A-RE: 5'-AGG TGG TGG GGC AGG TAA ATC TTC AA-3'

Gephyrin-Punktmutation an Aminosäure 188 von S zu E

GephS188E-FW: 5'-TT GAA GAT TTA CCT GAG CCA CCA CCT-3'

GephS188E-RE: 5'-AGG TGG TGG CTC AGG TAA ATC TTC AA-3'

Gephyrin-Punktmutation an Aminosäure 194 von S zu A

GephS194A-FW: 5'-ACC ACC TCC TCT TGC TCC ACC TCC TAC AAC TA-3'

GephS194A-RE: 5'-TAG TTG TAG GAG GTG GAG CAA GAG GAG GTG GA-3'

Gephyrin-Punktmutation an Aminosäure 194 von S zu E

GephS194E-FW: 5'-A CCA CCT CCT CTT GAA CCA CCT CCT ACA ACT A-3'

GephS194E-RE: 5'-T AGT TGT AGG AGG TGG TTC AAG AGG AGG TGG A-3'

Real Time-PCR von Tcpl0b

Tcpl0bFW: 5'-TCC AAT GCT GGG GAA TAG AG-3'

Tcpl0bRE: 5'-TCG TCC CCA ACC TAC AAC TC-3'

Real Time-PCR von Acp1

Acp1FW: 5'-CAC CCA TTG CAG AAG CAG TA-3'

Acp1RE: 5'-GCC ATG ATT TCT TAG GCA GC-3'

Real Time-PCR von Fgd4 (Frabin)

Fgd4FW: 5'-CAA GTG CCT CCA AAA CCA TT-3'

Fgd4RE: 5'-ACT CCT CCA TCC TTG GCT TT-3'

Real Time-PCR von Prlr

PrlrFW: 5'-TGC TTA CAT GCT GCT TGT CC-3'

PrlrRE: 5'-ACC AGC AGG TGA ATG TTT CC-3'

Real Time-PCR von Psd3

Psd3FW: 5'-CTG TGT GGC AGC TGT GTT TT-3'

Psd3RE: 5'-TCT GCT TCA GCT TGC TTT CA-3'

Real Time-PCR von  $\beta$ -Aktin zur Normalisierung

$\beta$ -AktinFW: 5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA TT-3'

$\beta$ -AktinRE: 5'-CGG ATG TCA ACG TCA CAC TT-3'

Primer für pEGFP-C2-Gephyrin-Sequenzierung

pEGFPC1for: 5'-GAT CAC TCT CGG CAT GGA C-3'

pEGFPC1rev: 5'-CAT TTT ATG TTT CAG GTT CAG GG-3'

### 2.1.8. Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs oder Roche bezogen, und als Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 U/µl in die Reaktionen eingesetzt. T4-DNA-Ligase stammt ebenfalls von der Firma Roche (Manheim), PANScripT DNA-Polymerase von PAN<sup>®</sup>-Biotech GmbH (Aidenbach), Benzonase, Pfu-Turbo DNA-Polymerase, DNaseI und dNTP's von Invitrogen (Karlsruhe).

### 2.1.9. Tiere, Zelllinien & Bakterienstämme

Bezeichnung	Quelle
Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Wistar-Stamm	Hausinterne Zucht
Mäuse ( <i>Mus musculus</i> , C57/Black6)	Hausinterne Zucht
Thy1-GFP-Gephyrin Maus	Reddy <i>et al.</i> , in Arbeit
Human Embryonic Kidney-Zellen (HEK293T)	Stansfeld <i>et al.</i> , 1996
<i>Escherichia coli</i> BL21 DE3	Stratagene, Amsterdam
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Stratagene, Amsterdam

### 2.1.10. Verbrauchsmaterialien & Geräte

Bezeichnung	Lieferant
Autoklav	MMM GmbH, München
DNA-Gel-Elektrophoresekammer	Werkstatt MPIH, Frankfurt
Elektroporationsküvetten	Eurogentec, Köln
Elektroporator (Genepulser)	Bio-Rad, München
Entwicklungsmaschine Curix 60	AGFA, Bonn
Heizblock	Thermo Fisher, Schwerte
Heizsterilisator	Memmert, Büchenbach
Inkubator-Bakterienkultur	New Brunswick Scientific, Nürtingen

Inkubator-Zellkultur	Thermo Fisher, Schwerte
Latex-Handschuhe	Carl-Roth, Karlsruhe
Magnetrührer (Ikamag Reo)	IKA, Staufen
Mikrowelle	Siemens, München
Netzgerät	GE-Healthcare, Freiburg
Nanodrop	Implen GmbH, München
Nitril-Handschuhe	Carl-Roth, Karlsruhe
pH-Meter	Mettler / Toledo, Gießen
Photometer	Shimadzu, Duisburg
Proteingel-Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
PVDF-Membran	GE-Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorff, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorff, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Eppendorff, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Eppendorff, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäß 15 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Reaktionsgefäß 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Radiografie-Filme	GE-Healthcare, München
Sterilbank	Nuaire, Plymouth, USA
Thermocycler (Mx3000P qPCR Cycler)	Stratagene, Amsterdam
Thermocycler (Mastercycler)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Thermoschüttler	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Ultraschall-Applikator	Branson-Ultrasonics, Berkshire, UK
Vakuumzentrifuge (SpeedVac)	Savant / Thermo Fisher, Zellik, Belgien
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Waage (100 mg - 2000 g)	Heraeus, Hanau
Waage (0,1 mg - 200 g)	Heraeus, Hanau
Western Blot-Transferkammer	Bio-Rad, München
Whatman Papier	Millipore, Schwalbach
Tischzentrifuge (Picofuge)	Heraeus, Hanau
Ultra-Zentrifuge	Beckmann, Münster
Hochgeschwindigkeitszentrifuge (RC5C)	Thermo Fisher, Schwerte

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. Plasmid-DNA-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL1-Blue-Bakterien (Stratagene, Amsterdam) erfolgte unter Verwendung von Plasmid-Isolierungskits (Qiagen, Hilden). Die transformierten Bakterien wurden hierbei nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgeschlossen und das Lysat nach 5 min wieder neutralisiert. Große, schlecht lösliche Zellbestandteile wurden durch SDS im Lysepuffer solubilisiert und im Anschluss über die Zugabe hoher Kaliumkonzentrationen gefällt. Durch die Zugabe von Kalium entsteht aus SDS Kaliumdodecylsulfat, welches wesentlich schlechter in Wasser löslich ist als Natriumdodecylsulfat. Daher fällt Kaliumdodecylsulfat unter den herrschenden hohen Salzkonzentrationen aus. An das Detergenz gebundene Proteine, höhermolekulare Nukleinsäuren und Reste bakterieller Zellwände wurden gemeinsam mit dem Salz präzipitiert. Dieses wurde durch Zentrifugation bei  $14.000 \times g$  für 10 min sedimentiert. Lösliche Plasmid-DNA-Moleküle im Überstand wurden danach an eine Anionentauscher-Matrix in Form einer Säule gebunden. Ungebundene Bestandteile wurden ausgewaschen und die reine Plasmid-DNA anschließend mit einer hochkonzentrierten Salzlösung eluiert. Salz und Plasmid-DNA ließen sich durch eine Isopropanol-Fällung voneinander trennen. Das DNA-Pellet wurde dann in Wasser oder TE-Puffer gelöst.

### 2.2.2. Restriktionsverdau

DNA kann mit Hilfe von bakteriellen Restriktionsenzymen an definierten Sequenzen hydrolysiert werden. Hierzu wurden kommerziell erhältliche Enzyme (siehe 2.1.8.), zusammen mit spezifischen Puffern eingesetzt. Für 2  $\mu\text{g}$  DNA wurden 10 U des Enzyms mit passendem Puffer in einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  zusammengegeben und für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Inkubationszeiten und Reaktionsvolumina können gegebenenfalls abweichen und sollten daher für jedes Enzym etabliert werden, da nicht-optimale Bedingungen auch zu Veränderungen der Enzymspezifität, sogenannter Star-Aktivität, führen können.

### **2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese**

Endogene Nukleinsäuren, sowie DNA und RNA aus *in vitro* Reaktionen und auch deren Hydrolyseprodukte können elektrophoretisch aufgetrennt werden. Im Gegensatz zu vielen Proteinen ist DNA wasserlöslich und besitzt *per se* eine negative Ladung. Da für Nukleinsäuren ein lineares Masse-Ladungsverhältnis gegeben ist, wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld mit Geschwindigkeiten umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Kleinere Teilchen wandern somit schneller als größere in Richtung Anode. Als Matrix für die Elektrophorese wurden generell Gele aus 1-2% Agarose in TAE-Puffer verwendet. Um die farblosen Gele leichter beladen und die Dauer der Elektrophorese besser abschätzen zu können, wurden die DNA-Proben vor dem Auftragen mit einer Glycerin enthaltenden Farbstofflösung versetzt. Der Farbstoff migrierte während der Elektrophorese an der Lauffront, und der Strom konnte vor dem Auslaufen der Probe an der Anodenseite gestoppt werden. Zur Trennung von Nukleinsäuren über eine Strecke von 10 cm langes 1% Agarosegel wurde für etwa 45 min eine Spannung von 120 V angelegt. Entstehende DNA-Banden wurden mit einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend im UV-Licht sichtbar gemacht (rote Fluoreszenz). Über den Vergleich mit DNA-Standards bekannter Größen konnte die Moleküllänge in Basenpaaren bestimmt werden.

### **2.2.4. Transformation von Bakterien durch Elektroporation**

Elektrisch kompetente *E. coli* XL1-Blue-Bakterien wurden in einer speziellen Küvette einem kurzen elektrischen Puls von hoher Feldstärke ausgesetzt. Dies führte zu einer kurzzeitigen Instabilität der bakteriellen Zellwände, wodurch Plasmid-DNA-Moleküle in die Bakterien eindringen können. Im Anschluss wurde 1 ml LB-Medium zu den 100 µl Bakterien gegeben, und diese für 90 min unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die kultivierten Bakterien wurden bei 2000 × g für 10 min sedimentiert und in 150 µl resuspendiert, bevor der Ansatz auf Selektionsagarplatten ausgestrichen wurde. Elektrisch kompetente Zellen wurden von Belquis Nassim-Assir zur Verfügung gestellt.

### **2.2.5. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock**

Je 100 µl chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue- oder BL21 DE3-Bakterien (Merck Biosciences GmbH) wurden mit 10-50 ng Plasmid DNA versetzt und so für 15-30 min auf Eis stehend inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 30 s im 42°C warmen Wasserbad erhitzt

und anschließend 1-2 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 1 ml 37°C-warmem LB-Medium wurden die Bakterien für 90 min unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Es folgte die Sedimentation wie unter 2.2.9. beschrieben, und das Ausstreichen der Bakterien auf Selektionsagarplatten.

### **2.2.6. RNA-Präparation aus Gehirn von Mäusen**

WT- und Gephyrin-KO-Mäuse wurden im Alter P0 decapitiert und die Gehirne herauspräpariert. Anschließend wurde mit einer Pinzette das Cerebellum jedes Hirns abgetrennt, die so entstehenden groben Vorderhirnpräparationen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Um die RNA aus dem Gewebe zu extrahieren, wurde TRIzol® Reagenz, wie in den Herstelleranweisungen beschrieben, verwendet:

Je ein Hirn wurde in ein 2 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß gegeben und nach Zugabe von 1 ml TRIzol®-Reagenz mit einem elektrischen Homogenisator zerkleinert. Die vollständige Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen wurde durch eine 15 min Inkubation bei Raumtemperatur erreicht. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform. Zum Mischen der organischen und anorganischen Phase wurde das verschlossene Reaktionsgefäß für etwa 15 s per Hand geschüttelt. Nach einer 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe nun für 5 min bei 12.000 × g und 4°C zentrifugiert. Als Resultat erkennt man eine deutliche Trennung der rötlichen Phenol-Chloroform-Phase, einer Interphase und einer oberen, wässrigen Phase, in welcher die RNA gelöst ist. Um die RNA zu präzipitieren, wurde 1 ml Isopropanol in einem frischen 2 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und die wässrige, RNA-haltige Phase der Präparation hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 min bei 12.000 × g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 75% Ethanol gewaschen, erneut für 5 min bei 7.500 × g und 4°C zentrifugiert und anschließend getrocknet. Das reine RNA Pellet wurde in sterilem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### **2.2.7. Microarray**

Für die Microarray-Experimente wurden Expressionsmicroarray-GeneChips® (Affimetrix, High Wycombe, UK) verwendet, welche in Kooperation mit Dr. Bernd Denecke an der RWTH Aachen hybridisiert und analysiert wurden. Das Vorgehen hierbei folgte der beiliegenden

Arbeitsvorschrift des GeneChips®, wie auch in früheren Publikationen der Arbeitsgruppe beschrieben (Johann *et al.*, 2006). Es wurden sechs RNA Präparationen (siehe 3.4.2.) an Dr. Bernd Denecke (RWTH Aachen) geschickt. Dort wurde aus den original RNA-Proben komplementäre biotinylierte RNA hergestellt und diese anschließend in 35-200 Basen lange Stücke fragmentiert. Diese sechs Proben wurden jeweils mit einem Affymetrix® Exon-Array Expressionschip hybridisiert und die auf dem Chip gebundene biotinylierte RNA mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt. Die Daten der sechs Expressionschips wurden im Labor von Dr. Bernd Denecke mit einem Affymetrix® GeneChip® Scanner 3000 ausgelesen und statistisch ausgewertet.

### **2.2.8. Reverse Transkription**

Reverse Transkription bedeutet das Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (cDNA). Hierzu setzt man ein rekombinantes virales Enzym, die reverse Transkriptase eines Moloney Maus Leukämie-Virus, ein. Vor der reversen Transkription wurden die Proben zunächst mit DNase verdaut. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass sie lediglich RNA als Nukleinsäure, jedoch keine DNA mehr enthalten. Hierzu wurden 2 µg RNA jeder Probe für 15 min bei Raumtemperatur mit 2 U DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) und 2 µl Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 2 µl einer 20 mM EDTA-Lösung hinzugegeben und das Enzym für 10 min bei 65°C inaktiviert. Nach kurzem Kühlen der Proben auf Eis wurden 0,5 µg RNA (5 µl aus Verdau) in die reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt. Hierbei wurden 3 µl Oligo dT Primer mit 10 µl FirstStrand-Mix, 1 µl DEPC-Wasser und 1 µl AffinityScript® Enzym aus einem AffinityScript® FirstStrand-Synthesekit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) mit der RNA gemischt. Zur Anlagerungsreaktion wurde die Probe für 5 min bei 25°C inkubiert, bevor die DNA-Strangsynthese für 15 min bei 42°C durchgeführt wurde. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Probe für 5 min bei 95°C inaktiviert, und im Anschluß kurz auf Eis abgekühlt. Die cDNA-enhaltene Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 2.2.9. PCR

### 2.2.9.1. Genotypisierung von Gephyrin-KO-Mäusen

Zur Extraktion genomischer DNA wurde je 5 mm Schwanzspitzengewebe der zu untersuchenden Maus in 0,5 ml Lysispuffer mit 3,2 µl Proteinase K (La Roche AG, Basel) gegeben und über Nacht bei 55°C und 1200 rpm auf dem Schüttler lysiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 10 min bei 11.000 × g zentrifugiert (Heraeus Biofuge Pico), um verbliebene Feststoffe zu sedimentieren. Die DNA-enhaltenden Überstände wurde in ein 500 µl Isopropanol enthaltendes Reaktionsgefäß dekantiert. Durch mehrfaches Invertieren der Probe fällt die DNA sichtbar aus und wurde daraufhin durch erneute Zentrifugation pelletiert. Das so erhaltene DNA-Pellet wurde einmal kurz in 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 100 µl Wasser gelöst. Es folgte die Amplifikation von WT-Gephyrin- und / oder rekombinanten Neomycin-Fragmenten über PCR. Die resultierenden WT-Gephyrin-Amplikons zeigten eine Länge von 350 bp, Amplikons der Neomycin-Kassetten (KO-Allel) waren 450 bp lang. DNA-Amplikongrößen wurden über Agarose-Gelelektrophorese und den Vergleich mit DNA-Größenstandards bestimmt.

Braun Reinstwasser	20 µl	initiale Denaturierung 94°C	3 min
10x Puffer (-MgCl)	2,5 µl	Denaturierung 94°C	30 s
50 mM MgCl	0,5 µl	Anlagerung 55°C	30 s
100 mM dNTPs	0,3 µl	Verlängerung 72°C	90 s
F1 Primer	0,1 µl	finale Verlängerung 72°C	3 min
F3/R3 Primer	0,1 µl		
30 Zyklen (ohne initialen und finalen Schritt)			
Pan Taq	0,5 µl		
DNA-Lösung	1 µl		
Gesamtvolumen	25 µl		

### 2.2.9.2. Generierung von Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten

Die cDNA Vorlage für die Einführung von Punktmutationen ist ein pEGFP-C2-Gephyrin-shortnew Plasmid (Saiyed et al 2007). Dieser kodiert für die P1-Isoform des Gephyrin-Gens welches N-terminal mit dem grün fluoreszierenden Protein (eGFP) fusioniert ist. Auf Grundlage

dieser cDNA wurden 25 Runden einer Mutagenese-PCR durchgeführt. Hierbei wurde ein Quick Change-Mutagenesekit XL (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Dieses beinhaltet eine Pfu-Turbo DNA-Polymerase (10 U/µl), 10× Reaktionspuffer und Quick Solution. Im Anschluss an die Amplifikation wurde das PCR Produkt mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut, welches selektiv methylierte und dementsprechend nur die maternale DNA aus Bakterien hydrolysiert. Die resultierende DNA aus der in vitro Reaktion wurde in chemisch kompetenten E. coli XL1-Blue-Bakterien amplifiziert, aufgereinigt und durch DNA Sequenzierung überprüft (MWG-Biotech, Martinsried).

Braun Reinstwasser	29 µl	initiale Denaturierung 95°C	1 min
10x Pfu-Turbo-Puffer	5 µl	Denaturierung 95°C	50 s
Quick Solution	3 µl	Anlagerung 60°C	50 s
5 mM dNTPs	5 µl	Verlängerung 72°C	10 min
FW-Primer	3 µl	finale Verlängerung 72°C	30 min
RE-Primer	3 µl	25 Zyklen (ohne initialen und finalen Schritt)	
Pfu-Turbo	1 µl		
<u>50 µg DNA</u>	<u>1 µl</u>		
Gesamtvolumen	50 µl		

### 2.2.9.3. RT-PCR

Bei der RT-PCR handelt es sich um die Amplifikation von cDNA Fragmenten, welche durch eine reverse Transkriptionsreaktion aus RNA entstanden (siehe 2.2.8.). Für die PCR-Reaktionen wurden speziell zu diesem Zweck synthetisierte Primerpaare (Metabion GmbH, Martinsried) mit den unter 2.1.7. beschriebenen Sequenzen und die Panscript DNA-Polymerase (PAN-Biotech GmbH, Aidenach) verwendet. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass die vorwärts-, bzw. rückwärts-Primer-Bindestellen auf verschiedenen Exons liegen und somit mindestens ein Intron überspannen. Hierdurch sollte die Möglichkeit der Amplifikation genomischer DNA Templates minimiert werden. Da dies jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, war es wichtig die Größe der PCR-Produkte über DNA-Gelelektrophorese zu überprüfen.

Braun Reinstwasser	36,75 $\mu$ l	initiale Denaturierung 94°C	3 min
10x Puffer (-MgCl)	5 $\mu$ l	Denaturierung 94°C	45 s
50 mM MgCl	1,5 $\mu$ l	Anlagerung 55°C	30 s
10 mM dNTPs	1 $\mu$ l	Verlängerung 72°C	90 s
Primer Mix (je 10 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l	finale Verlängerung 72°C	10 min
cDNA aus RT-Reaktion	3 $\mu$ l	30 Zyklen (ohne initialen und finalen Schritt)	
<u>Pan Taq</u>	<u>0,25 <math>\mu</math>l</u>		
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l		

#### 2.2.9.4. qRT-PCR

Mit Hilfe der qRT-PCR können in einer PCR-Reaktion entstehende Amplikonmengen quantitativ bestimmt werden. Da für die Reaktion aus RNA transkribierte cDNA als Template eingesetzt wurde, können Rückschlüsse auf den Gehalt bestimmter messenger-RNA-Moleküle in der ursprünglichen Probe gezogen werden. Für alle qRT-PCR Experimente wurde Brilliant® II SYBR® Green qPCR Master Mix (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Dieser Mix enthält einen Cyanin-Farbstoff (SYBR Green), welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Der entstehende DNA-Farbstoffkomplex absorbiert Licht bei 488 nm und besitzt ein Emissionsmaximum bei 522 nm Wellenlänge. Eine kontinuierliche Messung der Fluoreszenzintensität bei 522 nm zeigt somit permanent den Gehalt doppelsträngiger DNA in der Probe an. Die Amplifikation und das Auslesen der Fluoreszenz erfolgte mit einem Mx3000P qPCR-Cycler (Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

Braun Reinstwasser	10,125 $\mu$ l	initiale Denaturierung 94°C	3 min
qPCR Master Mix	12,5 $\mu$ l	Denaturierung 94°C	45 s
Primer Mix (je 10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	Anlagerung 55°C	30 s
ROX Reference Dye (2 $\mu$ M)	0,375 $\mu$ l	Verlängerung 72°C	60 s
<u>cDNA Probe</u>	<u>1 <math>\mu</math>l</u>	finale Verlängerung 72°C	10 min
Gesamtvolumen	25 $\mu$ l	30 Zyklen (ohne initialen oder finalen Schritt)	

## 2.2.10. Sequenzierung von PCR-Amplikons

Um bei der RT-PCR entstehende Amplikons zuverlässig sequenzieren zu können, wurden PCR-Produkte zunächst in ein Plasmid kloniert. Hierzu wurde ein TOPO-TA-Klonierungskit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. PCR Amplikons aus Reaktionen mit Taq-DNA-Polymerase tragen sequenzunabhängig immer überstehende 3'-Desoxyadeninreste (A). Das TOPO-TA-Kit beinhaltet einen linearisierten DNA-Vektor, welcher überhängende 3'-Desoxthymidinreste (T) besitzt. Außerdem ist an diese offenen Enden das Enzym Topoisomerase I des Vaccinia-Virus gebunden. Dieses Enzym katalysiert die Fusion der PCR Produkte mit den offenen Enden des Vektors.

4 µl PCR Produkt, 1 µl Salz Lösung und 1 µl des TOPO-Vektors wurden vorsichtig gemischt, und zur Ligation 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch 5 minütiges Kühlen der Probe auf Eis gestoppt. Je 2 µl des Ansatzes wurden zur Amplifikation der DNA in *E. coli* XL1-Blue-Bakterien elektroporiert. Die aufgereinigte Plasmid-DNA aus diesen Bakterien wurde zur Validierung der DNA-Integration mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und die resultierende Fragmentgröße auf einem 1,5% Agarosegel überprüft. Bei erfolgter Integration wurden die Plasmid-DNA-Proben sequenziert, um die Spezifität der durchgeführten PCR zu validieren. Dies wurde bei MWG-Biotech in Martinsried unter Verwendung der Pyrosequenzierungsmethode durchgeführt (Gharizadeh et al., 1996). Immobilisierte, einzelsträngige DNA wurde dabei zu doppelsträngiger DNA komplementiert. Dies wurde durch sequenzielle Zugabe der Desoxynukleotid-Triphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP unter Anwesenheit einer DNA-Polymerase erreicht. Wenn das passende (komplementäre) Nukleotid anwesend ist und von der Polymerase umgesetzt wird, entsteht Pyrophosphat, welches durch ein weiteres Enzym in einer Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht wurde.

## 2.3. Zellbiologische Methoden

### 2.3.1. Kultivierung von HEK293T-Zellen

In flüssigem Stickstoff gefrorene HEK293T-Zellen wurden durch die Zugabe von Vollmedium (MEM<sup>+++</sup>) zügig aufgetaut und im Anschluss 5 min bei 500 × g zentrifugiert. Hierbei setzte sich DMSO ab, welches den eingefrorenen Zellen als Frostschutzmittel zugefügt worden war. Das entstehende Zellpellet wurde nun in MEM<sup>+++</sup> aufgenommen, resuspendiert und nach weiterem Verdünnen mit MEM<sup>+++</sup> bei 37°C und 3% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert.

### 2.3.2. Passagieren von HEK293T-Zellen

Zum Passagieren von Zellen wurden diese einmal mit sterilem PBS gespült und anschließend für etwa 5 min mit 2 ml Trypsin-Lösung inkubiert. Sobald alle Zellen vom Schalenboden gelöst waren, wurden 8 ml MEM<sup>+++</sup> hinzugegeben und die Zellsuspension ca. 5 mal mit einer Glaspipette auf und abgezogen. Dies sollte die vollständige Dissoziation von Zellaggregaten in der Suspension sicherstellen. Die vereinzelt HEK293T-Zellen konnten nun auf mehrere Petrischälchen verteilt und zur weiteren inkubiert werden. Durch leichtes, acht-förmiges Schwenken wurde gewährleistet, dass sich die Zellen gleichmäßig auf dem Schalenboden verteilen.

### 2.3.3. Transfektion von HEK293T-Zellen mit Plasmiden mittels Lipofectamine<sup>®</sup> 2000

Die zu transfizierenden HEK293T-Zellen wurden auf Deckgläschen (Ø 14 mm) in 24 Loch-Mikrotiterplatten ausgebracht, welche zuvor 1-2 h mit Fibronectin beschichtet worden waren. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 80-90% aufweisen. Es wurden 0,8 µg Plasmid-DNA in 50 µl serumfreiem Opti-MEM-Medium gelöst. Parallel wurden 2 µl Lipofectamine2000 in 50 µl des gleichen Mediums gelöst und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Ansätze vereint und die Lösung durch leichtes Schütteln gemischt. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor es in das Medium über den HEK293T-Zellen pipettiert wurde. Die 24 Loch-Platte wurde nun insgesamt geschwenkt, um eine gleichmäßige Mischung des Transfektionsansatzes mit dem Medium zu gewährleisten und die Zellen so für mindestens 7 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.3.4. Infektion von HEK293T-Zellen mit AAV-Vektoren mittels der Ca<sup>2+</sup>-Phosphat-Methode**

Die verwendete Methode ist eine modifizierte Form des Transfektionsprotokolls von Graham & Van der Eb *et al.*, 1973 und ist auf die Synthese infektiöser Partikel eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) optimiert. DNA bildet dabei Komplexe mit Kalziumphosphat, welche durch Endocytose von eukaryotischen Zellen aufgenommen werden.

HEK293T-Zellen wurden auf Petrischalen (Ø 10 cm) kultiviert und einen Tag vor der eigentlichen Transfektion passagiert, sodass für den Versuch 20 Platten mit einer Konfluenz von 60% vorlagen. Ein Plasmid-Mix bestehend aus 200 µg pDP1, 160 µg pDP2 und 100 µg des das Zielgen enthaltenden AAV-hrGFP-Vektors wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht und gut gemischt. Die Plasmide pDP1 und pDP2 sind sogenannte Helfer-Plasmide und kodieren unter anderem für die viralen Proteine Rep und Cap, welche essentiell zur DNA-Replikation und Capsidbildung sind. Die Kombination dieser Plasmide erweitert das Infektionsspektrum des resultierenden Virus, da sie jeweils für Cap-Proteine mit unterschiedlichen Serotypen kodieren, was auch die Spezifität beeinflusst. Der das Zielgen enthaltene AAV-hrGFP-Vektor wurde bei Koexpression mit pDP1/2 in die entstehenden Capside rekrutiert, was zur Bildung infektiöser Viruspartikel in den HEK293T-Zellen führt.

Zu diesem Plasmid-Mix wurden nun 7,8 ml H<sub>2</sub>O und 1,25 ml einer 1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben. Das Gemisch wurde sofort gevortext und zur Bildung von DNA Komplexen 10 ml einer 2× BES-Lösung hinzugegeben und erneut gevortext. Es folgte eine Inkubation der Transfektionslösung für 5 min bei RT. Danach wurde die Lösung mit 120 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium (MEM<sup>+++</sup>) gemischt und das Zell-überstehende Medium jeweils gegen 7 ml des Transfektionsansatzes getauscht. So wurden die Kulturen für 4 h bei 3% CO<sub>2</sub> und 37°C und anschließend für weitere 3 Tage bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C im Brutschrank inkubiert. Zum Ernten der Virus-exprimierenden Zellen wurden diese im überstehenden Medium suspendiert, in 4 bis 5 50 ml Falcon-Gefäßen gesammelt und durch eine Zentrifugation für 10 min bei 1000 × g sedimentiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### **2.3.5. Reinigung von Viruspartikeln**

Die gesammelten Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurde eine 50 mM Tris / 150 mM NaCl Lösung (pH 8,5) hergestellt. Zu jedem Pellet wurden 1 ml dieser physiologischen Pufferlösung und vereint die Ansätze in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben.

Hierzu wurden wiederum 2  $\mu$ l Benzonase gegeben, alles durch Invertieren gemischt und die Suspension für 30 min im 37°C-warmen Wasserbad inkubiert. Es folgte die Zugabe und das Lösen von 584 mg NaCl in der Zellsuspension. Durch eine Zentrifugation für 30 min bei 4000  $\times$  g im Festwinkelrotor wurden die Zellen pelletiert und durch erneutes Resuspendieren mit einer 10 ml Pipette mechanisch lysiert. Im Anschluss wurde die Lösung eingefroren. Hierzu wurde das Röhrchen in mit Trockeneis gekühltes Ethanol gestellt. Sobald die Suspension gefroren war, wurde sie aus dem Ethanolbad genommen und zum Auftauen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Dieser Zyklus aus Einfrieren und Auftauen wurde noch zweimal wiederholt. Größere Zellfragmente wurden durch eine Zentrifugation für 30 min bei 4000  $\times$  g im Festwinkelrotor sedimentiert. Der Viruspartikel enthaltende Überstand wurde für die weitere Aufreinigung über differentielle Zentrifugation verwendet.

Zentrifugenröhrchen der Firma Beckmann (25 mm  $\times$  90 mm) wurden mit diskontinuierlichen Iodixanol-Gradienten beschickt. Hierzu wurde zunächst 3 ml 54% Iodixanol in die Gefäße vorgelegt und danach vorsichtig mit 3 ml 40%, 4 ml 25% und 6 ml 15% Iodixanol-Lösung überschichtet. Auf diese Dichtegradienten wurden nun ca. 3 ml Viruspartikel-enthaltende Zellkulturüberstände gegeben und die Röhrchen gegeneinander austariert. Es folgte eine Ultra-Zentrifugation für 2 h bei 300.000  $\times$  g und 18°C im Auschwingrotor. In diesem Schritt reicherten sich vorhandene Viruspartikel an der untersten Trennschicht des Gradienten, zwischen 54% und 40% Iodixanol, an. An dieser Stelle konnten sie mit einer langen Kanüle abgesaugt und gesammelt werden. Eine weitere Anreicherung der Capside wurde durch Filtrierung mit 20 ml-Amicon Säulen (Millipore, Schwalbach) erreicht, welche eine Ausschlussgröße von 100 kDa besitzen. So konnte das Volumen der Virussuspension auf etwa 200  $\mu$ l eingeschränkt werden. Aliquots dieser Proben wurden in Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### **2.3.6. Präparation und Kultivierung von murinen Hippocampusneuronen**

Vor der eigentlichen Präparation sollten ausreichend viele Deckgläschen ( $\varnothing$  14 mm) vorbereitet werden. Hierfür wurden die Deckgläschen über Nacht in Ethanol gewaschen, zum Trocknen auf sauberem Filterpapier ausgebreitet und danach über Nacht bei 140°C in einem Becherglas sterilisiert. Am Tag vor der Präparation wurden 24 Loch-Platten mit je 12 sterilen Deckgläsern bestückt und über Nacht bei 37°C mit 0,5 ml Polyornithinlösung (1,5  $\mu$ g/ml Polyornithin in PBS) überbeschichtet. Die Beschichtungslösung wurde am nächsten Tag abgenommen und die Deckgläser 2 $\times$  kurz mit PBS gewaschen, bevor 0,5 ml DMEM<sup>\*\*\*\*</sup> in jedem Loch vorlegt und die Platten so für mindestens 2 h während der Präparation bei 37°C inkubiert

wurden.

Für die Präparation von Hippocampusneuronen wurden tragende Wistar-Ratten (E18,5) mittels Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Das Tier wurde nun auf den Rücken gelegt und der Torso mit Lysoform-Desinfektionsspray benetzt. Das Fell wurde im Beckenbereich eingeschnitten und die gesamte Bauchdecke freigelegt, bevor diese wiederum geöffnet, den Uterus entnommen und in eine Petrischale überführt wurde. Anschließend wurden die Embryonen aus dem Uterus heraus präpariert, die Köpfe abgetrennt und diese für die Zeit der Präparation in 10 mM Glucose/PBS auf Eis gegeben.

Um das Hirn des Embryos freizulegen wurde der Kopf auf ein sauberes Papiertuch gelegt und die Kopfhaut und Schädelknochenanlagen entfernt. Hierzu wurde die Haut an der Schädelmitte mit zwei Pinzetten gefasst und in caudal/rostrale Richtung auseinander gezogen. Mit der Entfernung der Schädelknochenanlage wurde auf die gleiche Weise begonnen. Reste der weichen Knochen wurden anschließend vorsichtig mit der Pinzette abgehoben, das Gehirn von unten mit einer gebogenen Pinzette gefasst und für die Hippocampuspräparation in eine neue mit 10 mM Glucose/PBS gefüllte Petrischale überführt. Nun wurden die beiden Hemisphären voneinander getrennt, die Hirnhäute abgezogen und die Hippocampi herauspräpariert. Dazu wurde der Hippocampus mit einer gebogenen Pinzette umfasst und mit einer geraden Pinzette durch Scherbewegungen vom restlichen Gewebe getrennt. Für die Dauer der Präparation wurden die Hippocampi in einem auf Eis stehenden 50 ml Falcon-Röhrchen mit 10 mM Glucose/PBS gesammelt.

Nach der Präparation wurde der Puffer über den Hippocampi weitgehend abgesaugt. Das Gewebe wurde nun mit möglichst wenig Puffer in ein Eppendorff-Reaktionsgefäß pipettiert, in welches 1 ml Verdau-Lösung vorgelegt worden war. Zur Destabilisierung von Zell-Zell-Verbindungen wurden die Probe für 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden die Hippocampi zum Waschen kurz in 10 ml DMEM<sup>\*\*\*\*</sup> überführt, das überstehende Medium durch 1 ml frisches DMEM<sup>\*\*\*\*</sup> ausgetauscht und das Gewebe durch 10 bis 16 maliges Auf- und Abziehen mit einer 1 ml Pipette zerkleinert. Zu den dissoziierten Zellen wurde Medium gegeben, um ein Gesamtvolumen von 6 ml zu erreichen; ein Aliquot dieser Suspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Neuronen wurden nun auf die beschichteten Deckgläschen ausgebracht, wobei die Zellzahl pro Loch für Antikörperfärbungen bei 40.000 und für Transfektionen mit Lipofektamine2000 bei 60.000 liegen sollte. Nach 3 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium über den abgesetzten Zellen, je nach Dichte durch 500 µl bzw. 750 µl Neurobasalmedium<sup>\*\*\*\*</sup> ausgetauscht. Am

dritten Tag in Kultur (DIV3) wurde AraC in einer Endkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  zum Überstand hinzugegeben, um proliferierende Gliazellen abzutöten. Hippocampale Neuronen konnte so ohne Mediumwechsel bis zu vier Wochen in Kultur gehalten werden.

### **2.3.7. Transfektion von Hippocampusneuronen mit Lipofectamine® 2000**

Die zu transfizierenden Neuronen (DIV 9) lagen in einer Dichte von 60.000 Zellen pro Deckgläschen in einer 24 Loch-Schale vor. 2  $\mu\text{l}$  Lipofectamine2000 wurden in 100  $\mu\text{l}$  serumfreiem Neurobasalmedium gelöst und gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,1  $\mu\text{g}$  der zu transfizierenden DNA zu 0,9  $\mu\text{g}$  eines leeren pcDNA3.1-Vektors (Carrier) hinzugegeben und die Lösung erneut gut gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 20 min bei RT. Während dieser Zeit überführte man das Medium über den Zellen in ein benachbartes Loch der gleichen Platte und wusch die Neuronen einmal mit serumfreiem Neurobasalmedium. Zum Transfektionsgemisch gab man nun 200  $\mu\text{l}$  des zuvor abgenommenen, konditionierten Zellüberstandes, bevor man den gesamten 300  $\mu\text{l}$  Ansatz vorsichtig auf die Zellen pipettierte und 1-2 h bei 37°C inkubierte. Danach nahm man das Transfektionsgemisch ab, wusch die Neuronen ein Mal mit serumfreiem Neurobasalmedium und gab wieder den Rest des alten Zellüberstandes hinzu. Zur Expression von Gephyrin-Konstrukten wurden die Neuronen nach der Transfektion 6 Tage inkubiert.

### **2.3.8. Präparation und Kultivierung von murinen Rückenmarksneuronen**

Für die Präparation von Rückenmarksneuronen wurden tragende Wistar-Ratten (E14) mittels Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Wie oben beschrieben wurden die Embryonen entnommen und die Köpfe abgetrennt. Zur Entnahme des Rückenmarks legt man die Embryonen in eine trockene Petrischale und schneidet anteroposterior die Haut über dem Rückenmark auf. Das Rückenmark wurde nun herauspräpariert, in ein mit 33 mM Glucose/PBS gefülltes 3 cm Petrischälchen überführt und anschließend die feine Haut entfernt, welche es umschließt. Nach dem Sammeln aller Rückenmarke wurden diese in kleine Stücke geschnitten und zum Vereinzeln der Zellen mit einer 5 ml Glaspipette durch dreimaliges Auf- und Abziehen trituriert. Größere Zellverbände setzten sich innerhalb von 2-3 min am Gefäßboden ab. Der Überstand mit Einzelzellen wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, während die übrigen Gewebstücke erneut mit 3 ml 33 mM Glucose/PBS trituriert und die Zellen im Überstand ebenfalls in das neue Gefäß überführt wurden. Die gesamten 6 ml Zellsuspension wurden für 10 min bei 100  $\times$  g zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen, das Zellpellet in 1 ml Neurobasalmedium resuspendiert, und diese Zellsuspension anschließend mit Neurobasalmedium auf 5 ml aufgefüllt. Die Zelldichte der Suspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Standardmäßig wurden 120.000 Zellen auf jedes mit Polyornithin (siehe 2.3.6.) beschichtete Deckglas mit einem Durchmesser von 14 mm ausplattiert. Derart präparierte Rückenmarksneuronen können bis zu 5 Wochen bei 37°C und 3% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert werden.

### **2.3.9. Immuncytochemie**

HEK293T-Zellen oder Neuronen lagen kultiviert auf beschichteten Deckgläsern vor. Je nach Färbeprotokoll wurden die Zellen 15 min mit 4% PFA/PBS oder 2 min mit Methanol bei -20°C fixiert und anschließend 2 × 10 min in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Membranen inkubierte man die Zellen 15 min mit 0,4% Saponin/PBS (da Methanol Löcher in Zellmembranen verursachte, war es nicht nötig, Methanol-fixierte Zellen zu permeabilisieren). Nach kurzem Waschen in PBS wurden freie Proteinbindestellen durch eine einstündige Inkubation in 1%BSA/PBS abgesättigt. Damit waren die Zellen für die Inkubation mit Primärantikörpern vorbereitet, welche in entsprechender Verdünnung in 1%BSA/PBS gelöst wurden. Nach einer 1-2,5 stündigen Inkubation wurden diese durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit PBS entfernt, bevor die Deckgläschen mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern, ebenfalls gelöst in 1%BSA/PBS, für 50 min inkubiert wurden. Nach dem Entfernen der Sekundärantikörper färbte man die Kerne der Zellen für 2 min mit einer DAPI-Lösung an und bettete die Deckgläser nach erneutem Waschen mit Polyaquamount ein.

## **2.4. Histologische Methoden**

### **2.4.1. Präparation von Maus-Retina**

Für die Netzhautpräparationen wurden adulte Mäuse des Stammes C57/Black6 verwendet. Diese wurden zunächst durch das Inhalationsanästhetikum Isofluran (Deltaselect, Pfullingen) betäubt und durch Überstreckung des Genicks getötet. Die Augen wurden herauspräpariert kurz unterhalb der Linse angestochen und in 0,1 M PB überführt. Das Auge wurde nun kreisförmig um die Linse aufgeschnitten, Linse und Glaskörper entfernt. Zur Fixierung des Gewebes inkubiert man den gesamten Augenbecher für 10 min in 2%, bzw. 4% Paraformaldehyd in PB. Die fixierte Retina wurde in Anwesenheit von PB aus dem Augenbecher entnommen und mindestens drei

Mal für 10 min in PB gewaschen. Vor der Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die fixierten Netzhäute in verschiedenen Saccharose-Lösungen ansteigender Konzentrationen inkubiert. Dies soll die Eiskristallbildung und somit Beschädigungen des Gewebes beim Einfrieren verhindern. Hierzu beginnt man mit 10 % Saccharose in PB für 2 h, gefolgt von 20 % Saccharose in PB ebenfalls für 2 h und 30 % Saccharose mit 0,02 % Natriumazid in PB über Nacht. Diese Inkubationen wurden alle bei 4°C durchgeführt. Um Kryoschnitte anfertigen zu können, wurden die vorbereiteten Retinae zunächst für 15 min in Einbettmedium inkubiert und anschließend auf einen Objektträger des Kryostaten aufgefroren. Den gefrorenen Block aus Einbettmedium und Retina wurde nun in die richtige Orientierung gebracht. Der als schmaler Streifen sichtbare Querschnitt der Retina sollte orthogonal von der Klinge getroffen werden.

#### **2.4.2. Präparation von murinem Hirn und Rückenmark**

Adulte Ratten oder Mäuse wurden zunächst mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Deltaselect, Pfullingen) betäubt und im Anschluss durch Genickbruch getötet. Der Kopf wurde mit einer Schere abgetrennt und die Schädeldecke durch Entfernen der Kopfhaut freigelegt. Mit einer robusten Schere wurde nun, beginnend vom Hinterhauptsloch, der Schädelknochen aufgebrochen und in mehreren Schritten mit einer Spitzzange entfernt. Das so freigelegte Hirn kann mit einem feinen Spatel herausgehoben werden. Dicke Hirnnerven wurden hierbei mit einer Schere durchtrennt, um das Gehirn herauszulösen. Anschließend wurde das Gehirn mit einer Rasierklinge sagittal halbiert. Beide Hirnhälften müssen nun mit der Schnittkante nach unten auf ein Stück Alufolie gelegt und dieses nun auf einen Block Trockeneis platziert werden, um das Gewebe schnell einzufrieren.

Das Rückenmark von Ratten oder Mäusen wurde in einem Stück samt Wirbelsäule entnommen. Rippen und Muskelfasern wurden so weit wie möglich entfernt und die Wirbelsäule nun in ca. 2 cm lange Stücke zerteilt. Jedes dieser Teile wurde in ein mit Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) gefülltes Aluminium-Röllchen von etwa 1 cm Durchmesser gesteckt. Das so eingebettete Rückenmark konnte dann auf einem Block Trockeneis rasch eingefroren werden.

### **2.4.3. Anfertigung von Kryoschnitten**

Gehirn oder Rückenmark wurden stets frisch präpariert und auf einem Block Trockeneis gefroren (siehe 2.4.2.). Vor dem Schneiden müssen die Proben und das Gefriermikrotom auf eine einheitliche Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  gebracht werden. Bei Retina-Präparaten erübrigt sich dieser Schritt. Während des Schneidens sollte die Kammer-Temperatur für unfixierte Gewebe (Hirn und Rückenmark) bei ca.  $-18^{\circ}\text{C}$ , die Objekt-Temperatur bei  $-17^{\circ}\text{C}$  liegen, während für vorfixierte Retina-Schnitte eine Kammer-Temperatur von  $-21^{\circ}\text{C}$  eingestellt wurde. Hirn und Rückenmark wurden mit einer Dicke von  $14\ \mu\text{m}$ , Retinae mit einer Dicke von  $16\ \mu\text{m}$  geschnitten. Fertige Kryoschnitte zieht man auf Superfrost-Objektträger auf. Vor der weiteren immunhistochemischen Behandlung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur ca. 20 min trocknen gelassen.

### **2.4.4. Immunfärbung von Kryoschnitten**

Zunächst müssen alle Schnitte drei Mal in PBS, bzw. PB gewaschen werden, um Reste des Einbettmediums zu entfernen. Alle Lösungen für Retinapräparate wurden mit PB hergestellt, für Hirn und Rückenmark verwendet man PBS. Zur Fixierung von frisch geschnittenem Gewebe wurde ca. 1 ml gekühltes 4% Paraformaldehyd in PBS direkt auf den Objektträger gegeben. Die optimale Länge der Fixierung ist für viele Färbungen kritisch und sollte daher empirisch bestimmt werden. Generell lässt sich jedoch sagen, dass Glycinrezeptor-Färbungen mit kurzen Fixierzeiten (1 - 5 min) gut eingestellt sind, während Färbungen synaptischer Vesikelproteine oder von Gephyrin nach 10 - 15 min Fixierung am besten funktionieren. In manchen Fällen ist es auch ratsam, im Anschluss an die Fixierung eine Natriumcitrat-Behandlung der Hirnschnitte durchzuführen (siehe nächster Absatz). Unabhängig hiervon wurden die frisch fixierten Kryoschnitte zwei Mal für 10 min in PBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung der Zellmembranen und die Absättigung unspezifischer IgG-Bindestellen. Hirnschnitte wurden zu diesem Zweck für 1 h in Präinkubationslösung permeabilisiert und abgesättigt. Retina-Schnitte behandelt man für 30 min mit Retina-Blocklösung. Im Anschluss an diese Präinkubation wurden die Schnitte in Retina-Blocklösung bzw. für Hirnschnitte in Antikörperlösung gelöst und für 24 h bei RT mit den Primärantikörper inkubiert. Sollen verschiedene Primärantikörper verwendet werden, empfiehlt es sich, diese nacheinander mit dem Gewebe zu inkubieren. Zur Entfernung der Antikörper wurde mindestens drei Mal für 10 min im entsprechenden Puffer gewaschen. Sekundärantikörper löst man in Retina-Blocklösung, bzw. Antikörperlösung und inkubiert zur Bindung für 50 min bei RT. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen der Schnitte zur

Entfernung der Antikörper. Zum Schluss wurden die Kerne der Zellen für 5 min mit einer DAPI-Lösung angefärbt, die Schnitte nach erneutem Waschen mit Polyaquamount überschichtet und durch Auflegen eines Deckglases eindeckelt.

Benötigen Antikörper stark unterschiedliche Fixierzeiten des Gewebes und sollen zusammen auf einem Präparat angewendet werden, kann eine Natriumcitrat-Behandlung das Färbeergebnis optimieren. Hierfür wurden Kryoschnitte für 10 min mit kaltem 4% PFA/PBS fixiert und danach 10 min in PBS gewaschen, bevor sie für 10 min bei Raumtemperatur mit Natriumcitrat-Puffer äquilibriert wurden. Nach der Äquilibrierung wurden die Schnitte in im Wasserbad auf 95°C vorgeheizten Natriumcitrat-Puffer gegeben und bei dieser Temperatur für 30 min inkubiert. Hierdurch werden Epitope, welche durch die lange Fixierung maskiert wurden, wieder für Antikörper zugänglich gemacht. Das Puffergefäß mit den Schnitten wurde aus dem Wasserbad genommen und zum Auskühlen für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Präparate zweimal für 2 min in PBS gewaschen. Die so mit Natriumcitrat-Puffer behandelten Schnitte konnten nun nach dem Standardprotokoll für Hirnschnitte (siehe oben) permeabilisiert und mit Antikörpern gefärbt werden.

#### **2.4.5. Quantifizierung von immunreaktiven Synapsen in Zellkultur und Hirnschnitten**

Um Aussagen über Dichte und Verteilung von inhibitorischen Synapsen treffen zu können wurden die immungefärbten Präparate durch konfokale Mikroskopie analysiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden Bildserien optischer Schnitte mit einem Abstand von 0,3 µm aufgenommen. Kollokalisierungen wurden stets mit dem intakten Bildstapel in z-Ebene durch Vor- und Zurückblättern ausgewertet. So sollten zufällige Überlagerungen immunreaktiver Punkte ausgeschlossen werden. Zur zweidimensionalen Darstellung wurden diese Bilderreihen mittels eines Maximum-Projektions-Algorithmus der Leica TS- bzw. Axiovision-Software auf eine Ebene reduziert. Für die Auswertung von inhibitorischen Synapsen in Zellkulturfärbungen wurden je 50 µm Dendrit proximal vom Soma beginnend analysiert (n=10). Zur Quantifizierung gefärbter Synapsen in Retinaschnitten wurde die IPL auf 50 µm Breite analysiert (n=3 und n=6). Hierzu wurden die Bilder in 24 Felder unterteilt und für jedes dieser Felder die Anzahl der gefärbten Synapsen und der Überlagerungen bestimmt. Zur Bestimmung von Kollokalisationsraten in bestimmten Strata wurden nur die Felder der entsprechenden Bereiche für die Bewertung berücksichtigt. Referenzwerte für zufällige Kollokalisierung wurden in Anlehnung an vorherige Studien wie folgt generiert (Fletcher *et al.*, 2000; Grünert *et al.*, 2002). Jeweils der grüne Kanal aus den Bildern der Doppelfärbung wurde um 180° gedreht und anschließend wieder mit dem

zweiten Kanal überlagert. Diese Kontrollbilder wurden ausgewertet wie oben beschrieben.

## 2.5. Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1. Reinigung von Glycinrezeptoren aus Rückenmark

#### 2.5.1.1. Präparation von rohen synaptischen Membranen (Rosy)

Rückenmarksgewebe aus Ratten wurde in hypotonem Medium homogenisiert. Durch differentielle Zentrifugation des Homogenats in Saccharose-Lösung können synaptische Membranen in definierten Fraktionen angereichert werden. Myelin und andere Lipide wurden hierbei abgetrennt und verworfen.

Zur Homogenisierung wurden 36 g Rattenrückenmark mit 1,5 l eiskaltem Puffer A' mit 1,25 ml Stabilisatoren-Mix und 150 µl PMSF-Lösung (zur Proteasehemmung) versetzt. Das Gemisch wurde portionsweise in ein 60 ml Pottergefäß überführt und das Gewebe mit Hilfe eines „Potter S“ Homogenisators (Braun International Biotech, Göttingen) aufgeschlossen. Hierzu wurde eine Geschwindigkeit von 700 rpm eingestellt und der Kolben des Potters vier Mal durch die Suspension auf und ab bewegt. Neben der Entstehung von Luftblasen ist auch Wärmebildung zu vermeiden. Daher wurde die Homogenisation nach jedem Durchgang für etwa 20 s unterbrochen. Während der gesamten Prozedur wurde das Pottergefäß in Eiswasser gekühlt. Das Homogenat wurde für 40 min bei  $23.500 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,4 l Puffer A' (mit Zusätzen wie oben) resuspendiert. Danach folgte eine erneute Homogenisation und Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wie oben. Das resultierende Membran-Pellet wurde in 1,4 l Saccharose Puffer mit Protease-Inhibitoren resuspendiert, erneut in vier Durchgängen homogenisiert und anschließend 120 min bei  $23.500 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Um die Pelletfraktion nicht zu verunreinigen, kann eine möglicherweise entstehende Fettschicht mit einem sauberen Zellstofftuch entfernt werden. Das Pellet dieser Zentrifugation wurde erneut in 300 ml eiskaltem Puffer A' mit Protease Inhibitoren resuspendiert, gepottert wie oben und für 20 min bei  $48.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aus rohen synaptischen Membranen in 100 ml Puffer B mit Protease-Inhibitoren resuspendiert. Diese Rosy-Probe wurde in zwei 50 ml-Röhrchen überführt und nach Schockfrieren bei  $-70^{\circ}\text{C}$  über mehrere Monate gelagert werden.

### 2.5.1.2. Solubilisierung von Glycinrezeptoren aus Rosy

Integrale Membranproteine wie Glycinrezeptoren können mit nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100 aus Membranfraktionen roher synaptischer Präparationen solubilisiert werden. 60 ml Rosy wurden hierfür mit 12 ml Puffer B vermischt und in drei bis vier Durchgängen im Homogenisator gepottert. Die resultierende Suspension wurde im Anschluss in einen gekühlten Messzylinder gegeben und mit Puffer B auf ein Endvolumen von 90 ml aufgefüllt. In einen weiteren eisgekühlten Messzylinder wurden 60 ml GlyR-Solubilisierungspuffer vorgelegt, das Homogenat hinzu gegeben, und unter ständigem Rühren für 75 min im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Schaumbildung sollte hierbei unbedingt vermieden werden. Unlösliche Bestandteile im Homogenat wurden durch eine Ultrazentrifugation für 70 min bei 160.000 × g und 4°C sedimentiert. Der Überstand mit solubilisierten Proteinen wurde vorsichtig abgenommen und durch eine Glasfritte (G3) abfiltriert, um restliches weiches Lipidpellet zu entfernen. Die gesammelten ~135 ml Solubilisat (Detergenzextrakt) wurden schockgefroren und bei -70°C gelagert oder aber direkt für die Affinitätschromatografie verwendet.

### 2.5.2.3 Reinigung von Glycinrezeptoren über 2-Aminostrychnin-Agarose

Zur Reinigung des Glycinrezeptors (GlyR) aus solubilisierten synaptischen Membranen wurde immobilisiertes 2-Aminostrychnin verwendet. Das Nervengift Strychnin bindet mit hoher Affinität an GlyR  $\alpha$ -Untereinheiten. Diese Eigenschaft wurde hier für die affinitätschromatographische Anreicherung des GlyR genutzt.

Eine 5 ml Glassäule wurde mit 2-Aminostrychnin-Agarose gepackt (Geschenk von Dr. Bertram Schmitt, Frankfurt), über Schläuche an eine Pumpe angeschlossen und mit ca. 100 ml Puffer C gewaschen. Um eine möglichst effizient Bindung zwischen Strychnin und GlyR zu gewährleisten, wurde der Rosy-Detergenzextrakt (~135 ml) langsam (ca. 9 ml/h) auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss wurde mit ca. 100 ml Puffer D gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen und dann mit 1-2 ml Puffer E über Nacht rund-eluiert. Die hohe Glycinkonzentration in diesem Puffer verdrängt Strychnin durch Konkurrenz von der GlyR-Bindestelle und löst die spezifisch gebundenen Rezeptoren von den Agarose-Beads. Nach dieser ersten Elution wurde noch ein zweites Mal mit der gleichen Menge Puffer E nacheluiert.

## 2.5.2. Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E.coli*

### 2.5.2.1. Expression von Proteinen in Bakterien

Expressionsplasmide wurden über Hitzeschocktransformation (siehe 2.2.5.) in *E.coli* BL21 Zellen eingebracht. Das verwendete Plasmid beinhaltet ein Lac-Operon, welches sich durch Allolactose aktivieren lässt. Durch Zugabe der chemischen Substanz IPTG zur Bakterienkultur wurde die Anwesenheit von Allolactose imitiert, das Lac-Operon angeschaltet und die Expression des auf dem Plasmid kodierten Gens ausgelöst.

Transformierte Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und eine 5 ml LB-Vorkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Die Vorkultur wurde unter leichtem Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Das gesamte Volumen der Vorkultur wurde anschließend in eine 200 ml LB-Hauptkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben und diese bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7-0,9 bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Sobald die gewünschte Dichte erreicht war, wurde die gesamte Kultur mit Eis auf 25°C gekühlt und IPTG bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Während des Kühlens wurde ein Aliquot der Kultur (äquivalent zu 1 OD<sub>600</sub>) abgenommen (Probe Trafo) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die mit IPTG versetzte Hauptkultur wurde bei 25°C unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Anschließend wurde erneut ein Aliquot der Kultur (äquivalent zu 1 OD<sub>600</sub>) abgenommen (Probe IPTG) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert, bevor die gesamte Hauptkultur bei 5000 × g für 15 min sedimentiert wurde. Das entstehende Bakterienpellet wurde entweder sofort der Bakterienlyse zugeführt oder ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.5.2.2. Herstellung von geklärtem Bakterienlysat

Bakterien wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und Proteine durch die Zugabe von Detergenz extrahiert. Unlösliche Zellfragmente und DNA wurden durch Zentrifugation sedimentiert und somit das Bakterienlysat geklärt.

Ein Bakterienpellet aus 50 ml der ursprünglichen Kultur wurde unter Zugabe von 1 ml PBS durch leichtes Schütteln resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension unter ständiger Kühlung im Eisbad für 1 min auf Stufe 4 mit einem 50% Intervall sonifiziert (Ultraschall-Applikator von Branso Ultrasonics). Nach dem Aufschließen der Bakterien wurden 50 µl einer 20%igen (w/v) Triton X-100-Lösung zugegeben und die Suspension für 30 min bei 4°C auf dem

Rundschüttler solubilisiert. Durch eine 10 min Zentrifugation bei  $10.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  wurden anschließend ungelöste Zellbestandteile sedimentiert. Das geklärte Lysat wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.5.2.3. Reinigung von GST-Fusionsprotein aus Bakterienlysat

Zur Reinigung von GST-Protein aus Bakterienlysaten wurde die starke Bindung von GST an Glutathion ausgenutzt: an Sepharosekugeln immobilisiertes Glutathion kann zur Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen verwendet werden. Um nach dem Waschen der Beads/Kugeln gebundenes GST-Protein wieder von den Glutathion-Sepharosekugeln zu eluieren, wurde Glutathion im Überschuss zum Waschpuffer zugegeben oder eine enzymatische Spaltung durch geführt.

Zunächst wurden  $150 \mu\text{l}$  einer 80%igen Glutathion-Sepharose-Suspension in ein  $1,5 \text{ ml}$  Reaktionsgefäß gegeben und zweimal für je 5 min mit  $1 \text{ ml}$  PBS gewaschen. Zum Trennen von PBS und Glutathion-Sepharose-Kugeln wurde das Reaktionsgefäß für 2 min bei  $2000 \times g$  zentrifugiert. Während der gesamten Reinigung wurde im Kühlraum bei  $4^{\circ}\text{C}$  gearbeitet. Die gewaschenen Sepharose-Kugeln wurden nun in eine G50-Säule überführt (Amersham, Freiburg), welche zuvor mit PBS +  $0,1\%$  TritonX100 gespült wurde. Insgesamt wurden  $2 \text{ ml}$  des Bakterienlysats auf die mit Sepharosekugeln bepackte Säule gegeben und über ein Schlauchsystem und eine Pumpe durch die Säule hindurchgesaugt. Für die Inkubation des Bakterienlysats mit der Glutathion-Sepharose wurde das Schlauchsystem kurzgeschlossen, d.h. das durch die Säule gesaugte Lysat wurde der selben Säule erneut zugeführt. In diesem Aufbau wurde das Lysat für 2 h bei einer Fließgeschwindigkeit von etwa  $150 \mu\text{l}/\text{min}$  mit der Glutathion-Sepharose inkubiert. Während diese Vorganges bindet in im Lysat vorhandenes GST-Protein an das in der Säule immobilisierte Glutathion. Am Ende der Inkubation wurde der Schlauchkreislauf geöffnet und das Bakterienlysat verworfen. Das Waschen der Glutathion-Sepharose erfolgte durch Zugabe von insgesamt  $6,5 \text{ ml}$  PBS +  $0,1\%$  (w/v) Triton X-100 in die Säule. Die Waschlösung wurde ebenfalls mit  $150 \mu\text{l}/\text{min}$  durch die Säule hindurchgesaugt und anschließend verworfen. Ein Aliquot (ca.  $10 \mu\text{l}$ ) der Glutathion-Sepharose wurde abgenommen, als Probe „Beads“ gekennzeichnet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die in der Säule gebundenen GST-Fusionsproteine konnten durch eine enzymatische Spaltung aus der Säule eluiert werden (siehe 2.5.2.4.).

#### 2.5.2.4. Elution von immobilisiertem GST-Fusionsprotein durch Trombinspaltung

Der zur Herstellung von GST-GlyR $\beta$ loop verwendete pGEX-RB Expressionsvektor kodiert für eine Thrombinbindesequenz zwischen GST und dem GlyR $\beta$ -Peptid. Zur effizienteren Thrombinspaltung sind in der Sequenz zwischen Thrombinschnittstelle und Fusionsprotein 5 Glycinreste als Abstandhalter eingebracht. Das GlyR $\beta$ loop Peptid kann somit durch Inkubation mit der Protease Thrombin effizient von GST abgespalten werden und so aus der Säule ausgewaschen werden. Für die proteolytische Spaltung des in der Säule gebundenen Fusionsproteins (siehe 2.5.2.3.) wurden 20 U Thrombin in 150  $\mu$ l PBS verdünnt und auf die Säule gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die überstehende Lösung durch die Säule gesaugt und gesammelt. Verbliebenes GlyR $\beta$ -Peptid wurde durch zweimaliges Nachwaschen mit je 150  $\mu$ l PBS + 0,1% (w/v) Triton X-100 eluiert. Diese Eluate enthalten neben dem abgespaltenen GlyR $\beta$ -Peptid auch Thrombin. Um dieses zu entfernen, können die vereinigten Eluate über eine Benzamidinsäule weiter gereinigt werden (siehe 2.5.2.5.). Die in der Säule verbleibenden Glutathion-Sepharose-Kugeln mit gebundenem GST-Protein wurden erneut gewaschen, wie unter 2.5.2.3. beschrieben. Aliquots der Sepharosebead-Suspension wurden als „GST“ gekennzeichnet, schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

#### 2.5.2.5. Entfernung von Thrombin aus Lösungen durch Benzamidinsäulen

Zur Entfernung von Thrombin aus Lösungen kann die starke Bindung von Benzamidin an Serinproteasen ausgenutzt werden und in Säulen immobilisiertes Benzamidin zur Entfernung der Serinprotease Thrombin aus Lösungen verwendet. Der Durchlauf einer Lösung, welcher durch eine derartige Säule geschickt wurde, ist weitgehend frei von Thrombin.

Die aus mehreren Proteinreinigungsexperimenten (siehe 2.5.2.1-5) erhaltenen Fraktionen von GlyR $\beta$ -Peptid wurden von Thrombin befreit. Hierbei wurde ein HiTrap-Benzamidin-FF-Kit nach Herstelleranweisung verwendet. Die Benzamidin-Säule wurde zunächst mit dem fünffachen Säulenvolumen Wasser gewaschen. Anschließend wurden 500  $\mu$ l Proteinprobe auf die Säule gegeben und bei einer Fließgeschwindigkeit von 150  $\mu$ l/min durch die Säule hindurchgesaugt. Serinproteasen wie Thrombin binden hierbei an das in der Säule immobilisierte Benzamidin und werden dadurch in der Säule zurückgehalten. Der Durchfluss wurde gesammelt, als Probe „GlyR $\beta$ loop“ markiert, schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

## 2.5.3. Proteinanalytik

### 2.5.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE wurde benutzt, um denaturierte Proteine der Größe nach voneinander zu trennen. Das Prinzip der Trennung basiert auf der Migration geladener Teilchen im elektrischen Feld. Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an hydrophobe Bereiche von Proteinen. Dadurch werden diese entfaltet (denaturiert) und erhalten ein einheitliches Verhältnis von Ladung zu Masse. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die diskontinuierliche SDS-PAGE verwendet. Das bedeutet, dass der obere Teil des Gels einen niedrigen Acrylamidgehalt (4-5%) und einen leicht alkalischen pH von 8,0 hat. Dies führt zu einem gleichmäßigen Einlaufen und Sammeln der Proben. Der untere Teil des Gels besitzt einen höheren Acrylamidgehalt (7-15%) und einen pH von 6,4. Dieser entspricht dem isoelektrischen Punkt von Glycin, was eine Änderung der Ladungen im elektrischen Feld und eine Trennung der Proteine nach ihrer Masse bewirkt.

Glasplatten und 0,75-mm Spacer wurden zunächst mit Alkohol gereinigt, um Fette und andere Polymerisationsinhibitoren zu beseitigen, dann zusammengebaut und in die dafür vorgesehene Klemmvorrichtung gebracht. Die Trenngellösung wurde in Bechergläsern angesetzt, zunächst jedoch ohne den Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS) hinzuzufügen. Erst kurz vor dem Gießen des Gels wurde die Polymerisation mit APS gestartet und das Trenngel mit einer Pipette in die Gelkammer gefüllt. Im Anschluß wurde das Trenngel mit ca. 2 ml Isopropanol überschichtet. Auf diesem Weg erzielt man eine glatte Oberfläche und schließt Sauerstoff als potenten Polymerisationsinhibitor aus. Das Trenngel polymerisiert bei RT innerhalb von 20 min. Danach wurde das Isopropanol durch Invertieren der Kammer entfernt, die Sammelgellösung angesetzt und nach dem Starten der Polymerisation auf das Trenngel geschichtet. Um Taschen zu formen wurde ein Kunststoffkamm von oben in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. War das Sammelgel ausgehärtet, wurden der Kamm entfernt und die Taschen mit Wasser gespült. Das fertige Gel wurde samt Glasplatten aus der Haltevorrichtung genommen und in eine Elektrophorese-Kammer eingespannt. Diese wurde mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt, sodass beim Anlegen einer Spannung elektrischer Strom durch das Gel fließen konnte.

Proteinproben wurden vor dem Beladen des Gels mit 5×Probenpuffer und ca. 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol versehen und 10 min bei 95°C denaturiert. Da Membranproteine wie der Glycinrezeptor nach solch einer starken Erhitzung im Allgemeinen aggregieren, empfiehlt sich für solche Proteine eine Temperatur von nur 50 °C zur Denaturierung und die Zugabe von 200 mM DTT statt  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die vorbereiteten Proben wurden nun in die Geltaschen

gefüllt. Parallel hierzu wurden auch 5 µl des Protein-Größenstandards SeeBluePlus2 (Invitrogen) aufgetragen. Für jedes 0,75 dicke Gel sollte zunächst ein Strom von 10 mA, nach dem Einlaufen in das Trenngel ein Strom von bis zu 25 mA angelegt werden. Bevor die Lauffront aus dem Gel austrat, wurde die Elektrophorese gestoppt. Das fertige Gel konnte nun diversen Färbemethoden unterworfen oder der Western Blot Analyse zugeführt werden.

	Sammelgel	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Trenngel 15%
8 × Sammelgelpuffer	750 µl	-	-	-
4 × Trenngelpuffer	-	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
40% (w/v) Acrylamid-Mix	600 µl	1,88 ml	3 ml	3,75 ml
MilliQ H <sub>2</sub> O	4,5 ml	4,12 ml	3,5 ml	2,25 ml
10% (w/v) SDS-Stock	40 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	6 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10% (w/v) APS	60 µl	100 µl	100 µl	100 µl

### 2.5.3.2. Coomassie Brilliant Blue (CBB)-Färbung von Acrylamid-Gelen

Um durch Elektrophorese getrennte Proteine in Polyacrylamidgelen oder Nitrocellulose-Membranen sichtbar zu machen, wurden Coomassie- oder Silberfärbungen durchgeführt.

Die Gel-Färbungen mit CBB G-250 sind schnell, wenig giftig und gut reproduzierbar. Die Sensitivität der Methode reicht bis etwa 200-400 ng Protein/Bande. Während einer 15 minütigen Inkubation in CBB-Färbelösung bindet CBB G-250 mit hoher Affinität an hydrophobe Bereiche der Proteine. In der Färbelösung vorhandenes Methanol verdrängt Wasser aus der Gelmatrix, welche daraufhin schrumpft. Proteine wurden in der sich verengenden Matrix eingeschlossen und immobilisiert. Essigsäure zerstört die Hydrathülle der gelösten Proteine, wodurch sie ausfallen. Proteine wurden also in einem Schritt gefärbt und im Gel fixiert. Anschließend wurde das Gel zweimal für 15 min in CBB-Entfärber 1 geschüttelt. Ein hoher Anteil an Methanol sorgt für ein weiteres Schrumpfen des Gels und eine rasche Entfärbung. Es können weitere Inkubationen in CBB-Entfärber 2 folgen. Dieser besitzt einen geringeren Methanol-Anteil und ist folglich weniger effizient. Die Entfärbung wurde so lange fortgesetzt, bis das Gel nur noch eine minimale Hintergrundfärbung aufwies. Vorhandene Proteine wurden als kräftig blaue Banden sichtbar.

### 2.5.3.3. Kolloidale Silberfärbung von Acrylamid-Gelen

Um Proteinbanden in Polyacrylamidgelen mit hoher Empfindlichkeit sichtbar zu machen, wurde eine kolloidale Silberfärbung durchgeführt. Silberionen bilden Komplexe mit den Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten der Proteine, wobei sie zu Silberkeimen reduziert werden. Diese wirken im Gel als Reduktionskeime für die Färbung. Der exakte chemische Mechanismus der Färbung ist jedoch nicht gänzlich geklärt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit einem Silver Stain Plus-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. Hierzu wurde das Gel zunächst 20 min bei Raumtemperatur in Fixierlösung geschwenkt, was die Proteine im Gel zum Ausfallen bringt und immobilisiert. Anschließend wurde das Methanol der Fixierlösung durch 20 minütiges Schwenken in Waschlösung entfernt. Eine weitere Inkubation mit Silberlösung führte zur eigentlichen Färbereaktion. Vorhandene Proteine wurden hierbei als braune Banden sichtbar. Die Dauer der Färbereaktion betrug zwischen 10 und 20 min und wurde bei ausreichender Färbung sofort durch Waschen des Gels in Stopplösung beendet.

### 2.5.3.4. Western Blot

Alle Übertragungen von Proteinen auf PVDF- und Nitrocellulose-Membranen wurden mittels einer Tank-Blot-Apparatur (Mini Trans-Blot Cell, Biorad) durchgeführt. Hierzu wurde eine PVDF-Membran für 5 min in Methanol eingeweicht (bei Nitrocellulose nicht nötig), um vorhandene Proteinbindestellen zu aktivieren. Zwei Whatman-Filterpapiere, jeweils 1 mm dick, wurden kurz in Transferpuffer getränkt. Ein Stapel aus Filterpapier, PVDF-Membran, Gel und Filterpapier wurde in die Blotting-Apparatur eingespannt. Hierbei war die Orientierung des Stapels so auszurichten, dass die Membran in Richtung Anode und das Gel in Richtung Kathode zeigt. Zusätzlich musste sicher gestellt werden, dass alle Komponenten ausreichend mit dem Transferpuffer befeuchtet sind und sich keine Luftblasen innerhalb des Stapels befinden, da nur so ein homogenes elektrisches Feld erzeugt werden kann. Nun wurde die Blotkammer angeschlossen und eine Spannung von 10 V angelegt. Dies genügte, um die Proteine innerhalb von 16 h vom Gel auf die Membran zu transferieren.

### 2.5.3.5. Proteindetektion mittels Chemilumineszenz

Peroxidase-gekoppelte Antikörper können über Chemilumineszenz detektiert werden. Hierbei wird ausgenutzt, dass Peroxidasen die Oxidation von Luminol katalysieren, wobei Licht mit einer Wellenlänge um 428 nm emittiert wird. Dieses Licht kann mittels Blaulichtsensitiver Autoradiografiefilme detektiert und so für das menschliche Auge sichtbar gemacht

werden. Hierfür wurde standardmäßig ein Super Signal® Western Dura-Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) verwendet.

Den mit Antikörpern inkubierten Blot ließ man nach dem Waschen mit TBS gut abtropfen, jedoch nicht trocknen. Je 1 ml von Lösung 1 und 2 des Kits wurden auf den Blot gegeben und unter leichtem Schwenken für 3 min inkubiert. Den Blot wurde nun aus der Lösung genommen und gut abtropfen gelassen. Anschließend wurde der Blot blasenfrei in durchsichtige Folie eingeschlagen und in eine Autoradiografie-Kassette gelegt. Alle folgenden Schritte wurden bei geeignetem Rotlicht durchgeführt. Ein Autoradiographie-Film wurde ggf. zurechtgeschnitten und auf die eingeschlagene Membran gelegt. So wurde der Film in der geschlossenen Kassette belichtet. Der belichtete Film wurde einer Entwicklungsmaschine zugeführt, wodurch Position und Intensität von Proteinbanden auf dem Film sichtbar wurden.

#### **2.5.3.6. Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen**

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen wie Bakterienlysaten oder Präzipitaten wurde ein DC Protein-Test (Bio-Rad, München) nach Herstelleranleitung verwendet. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Form des Lowry-Tests. Es wird der Farbumschlag einer Lösung gemessen, welcher durch Kupfer-(III)-Ionen unter Anwesenheit von Peptidbindungen ausgelöst wird, und bei welchem letztendlich Molybdänblau entsteht. Um Proteinkonzentrationen in absoluten Werten bestimmen zu können, wurde eine Eichreihe mit BSA-Endkonzentrationen von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml als Referenz gemessen. Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 650-750 nm mit einem Photospektrometer (BioSpec Mini, Shimadzu) bestimmt.

#### **2.5.4. Herstellung monoklonaler Antikörper**

Die Immunisierung von Mäusen, die Immortalisierung Antikörper produzierender Zellen und die Tests zur Identifikation GlyR $\beta$ -bindender Antikörper in Mischklon-Überständen wurden von Synaptic Systems GmbH, Göttingen, durchgeführt. Die hierfür benötigten bakteriell exprimierten Proteine wurden in unserem Labor hergestellt (siehe 2.5.2.) und speziell für diese Experimente an Synaptic Systems übergeben.

#### 2.5.4.1. Immunisierung von Mäusen

Zur Immunisierung wurden Balb/c-Mäuse über einen Zeitraum von 17 Tagen jeden zweiten Tag und einen Tag vor der Zellfusion ca. 120 mg des Antigen-Peptids injiziert. Um die Antigenizität des gelösten Antigen-Peptids zu erhöhen die hierfür benötigt Gerbu oder Friends Adjuvant in Kombination mit CpG-Oligonukleotiden verwendet (Krieg, 2002)

#### 2.5.4.2. Fusion von B-Lymphozyten und Plasmazellen

Nach der Immunisierung von Mäusen mit dem Antigen-Peptid wurden Zellen aus dem Kniebereich, den Lymphknoten und der Milz der Tiere präpariert und kultiviert. Um aus diesen Zellen (hauptsächlich B-Lymphozyten) proliferierende Dauerkulturen anlegen zu können, wurden sie zunächst immortalisiert, d.h. unter Anwesenheit von PEG 1500 mit Ag8 Myelomazellen zu Hybridomazellen fusioniert. Nach der Fusion wurden die Zellen auf 360 Löcher von mehreren 24-Loch-Schalen verteilt. Diese 360 Kulturen werden auch als Mischklon-Kulturen bezeichnet, da jede von ihnen aus durchschnittlich 5-10 Einzelklonen besteht. Anschließend wurden die Kulturen für 10 Tage in Selektionsmedium kultiviert um auf fusionierte Hybridomazellen zu selektieren.

#### 2.5.3.3. ELISA

Die Anwesenheit GlyR $\beta$ -bindender Antikörper in den Mischklon-Überständen wurde durch einen enzymgekoppelten Immunabsorptionstest (ELISA) überprüft. Für den ELISA-Test wurden 96-Loch-Platten mit verschiedenen Testproteinen beschichtet und jeweils der Überstand eines Mischklons in ein Loch der behandelten Platten gegeben. Je nach Stärke der Antikörperbindung an das Testprotein, blieb mehr oder weniger Antikörper aus den Kulturüberständen an der Platte haften. Diese konnten anschließend durch enzymgekoppelte Sekundäantikörper gefärbt und die Färbeintensität mit Hilfe eines Scanners quantitativ erfasst werden.

## 3. Ergebnisse

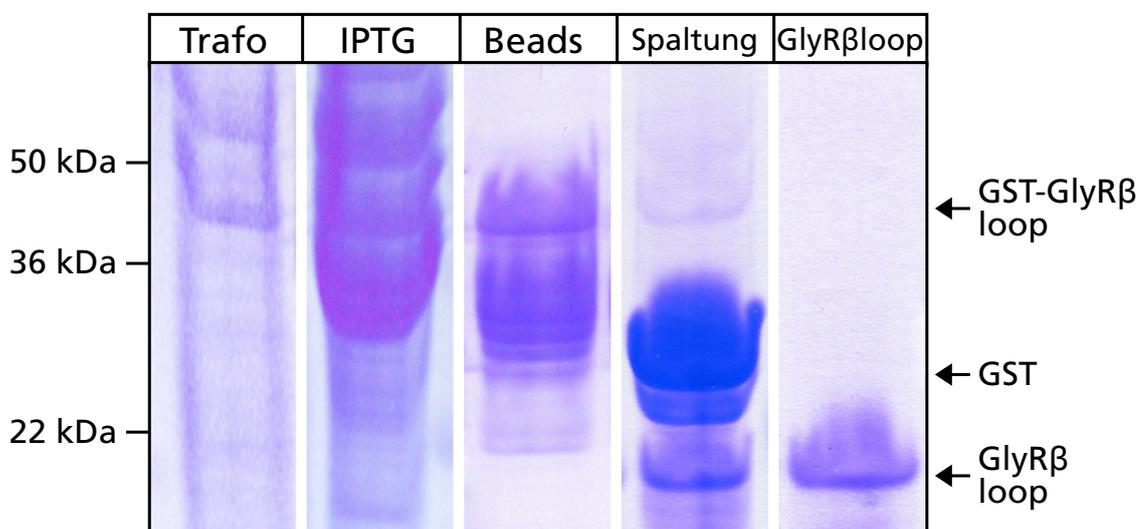
### 3.1. Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen die Glycinrezeptor- $\beta$ -Untereinheit (GlyR $\beta$ )

Die Expression von Glycinrezeptoren im Zentralnervensystem von Säugern wurde sowohl auf RNA- als auch Proteinebene eingehend untersucht. Für GlyR $\beta$ -mRNA wurde eine breite Verteilung im Gehirn und Rückenmark gefunden (Malosio *et al.*, 1991b). Im Gegensatz hierzu wurde GlyR-Protein hauptsächlich im Hirnstamm und Rückenmark nachgewiesen, in höheren Hirnregionen kommt es nur in sehr geringen Mengen vor (Becker *et al.*, 1993 ;Tohyama *et al.*, 1989). Die exakte Verteilung der GlyR $\beta$ -Untereinheit konnte bislang nicht immunologisch bestimmt werden, da kein spezifischer Antikörper zur Verfügung steht, der selektiv diese Untereinheit erkennt. Um die Lokalisation von GlyR $\beta$ -Protein im Gehirn festzustellen und um zu überprüfen, ob GlyR $\beta$  immer über Gephyrin an der Synapse geclustert ist, wurde in dieser Arbeit ein monoklonaler Antikörper gegen GlyR $\beta$  hergestellt.

#### 3.1.1. Herstellung und Aufreinigung des Antigen-Peptids

Die vier Gene für GlyR $\alpha$ -Untereinheiten sind in Ihrer Sequenz zu 80-90% identisch, und auch die GlyR $\beta$ -Untereinheit ist verglichen mit GlyR $\alpha$ 1 zu 47% homolog (Milani *et al.*, 1998). Um einen Antikörper herzustellen, welcher spezifisch an die  $\beta$ -Untereinheit von GlyRs bindet, muss ein Antigen so gewählt werden, dass es eine höchstmögliche Anzahl einzigartiger Aminosäurereste trägt. Gezielte Sequenzabgleiche ergaben, dass die GlyR $\beta$ -Untereinheit in der Sequenz der großen intrazelluläre Schleife (loop), zwischen den transmembranen Domänen 3 und 4, nur zu ca. 10% mit GlyR $\alpha$ -Proteinsequenzen identisch ist. Diese Schleife wurde daher als die vielversprechendste Domäne erachtet und der 120 Aminosäuren lange, cytosolische Bereich der GlyR $\beta$ -Untereinheit (GlyR $\beta$ loop) als Antigen zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers ausgewählt. Dann wurde die Nukleotidsequenz des GlyR $\beta$ loop über das pGEX-RB-GlyR $\beta$ <sub>336-455</sub> Expressionskonstrukt in Bakterien des Stammes *E.coli* BL21 DE3 eingebracht, und als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert (siehe 2.5.2.). Transformierte Bakterien produzierten bereits geringe Mengen des GST-GlyR $\beta$ loop-Proteins (40 kDa), was in der Proteinfärbung des SDS-Gels (siehe 2.5.3.1.-2.) als leichte blaue Bande sichtbar wird (Abb. 1, Probe Trafo, Pfeil). Oberhalb dieser Bande ist eine weitere Bande in der gleichen Spur zu sehen. Hierbei könnte es sich um nicht aufgelöste Fusionsprotein-Dimere, oder aber auch um ein bakterielles Chaperonprotein wie DnaK (ca. 80 kDa), handeln. Die Expression des eingebrachten Plasmids

überstieg die Expression endogener Bakterienproteine um ein Vielfaches. Daher wurde die Färbung frühzeitig gestoppt, endogene Proteine wurden so im Bakterienlysat kaum sichtbar. Da der pGEX-RB Expressionsvektor einen IPTG-induzierbaren Promotor trägt, ließ sich durch die Zugabe von IPTG die Expression des GST-GlyR $\beta$ loop anschalten und die Proteinproduktion weiter erhöhen. Die Proteinfärbung einer Probe induzierter Kulturen ist in **Abb. 1**, Spur **IPTG** gezeigt. Anschließend wurde das GST-Fusionsprotein aus dem Lysat der geernteten Kulturen durch Bindung an Glutathion-Beads aufgereinigt (siehe 2.5.2.). Die Auftrennung eines Aliquots dieser Beads über ein SDS-Gel produzierte mehrere Proteinbanden (**Abb. 1**, Probe **Beads**). Bei der obersten Bande handelt es sich um GST-GlyR $\beta$ loop-Protein, weitere Banden unterhalb sind Degradationsprodukte dieses Fusionsproteins. Da alle diese leicht degradierten Proteine über das N-terminal fusionierte GST aufgereinigt wurden (siehe 2.5.2.), kann man davon ausgehen, dass bakterielle Enzyme vom C-Terminus her Teile des GlyR $\beta$ loop Peptids hydrolysieren. Um durch gezielte enzymatische Behandlung GST vom restlichen Peptid abzuspalten, wurde die Protease Thrombin zugegeben (siehe 2.5.2.4.). Die Auftrennung eines Aliquots der Thrombin-behandelten Beads ist in **Abb. 1**, Spur **Spaltung** gezeigt.



**Abb. 1: Expression und Aufreinigung des Antigen-Peptids.** *E.coli* BL21 DE3 Bakterien wurden mittels Hitzeschock mit dem Expressionsplasmid pGEX-GST-GlyR $\beta$ <sub>336-455</sub> transfiziert. Eine Probe dieser Bakterien wurde abgenommen und lysiert (Probe **Trafo**). Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch die Zugabe von 200  $\mu$ M IPTG induziert. Nach 16 h Inkubation bei 25°C wurden die Bakterien geerntet und lysiert (Probe **IPTG**). Rekombinantes GST-Fusionsprotein wurde über Glutathione-Sepharose Beads aus dem Lysat gereinigt (Probe **Beads**). Durch die Inkubation dieser Beads mit der Protease Thrombin wurde das GlyR $\beta$ loop Peptid von GST abgespalten (Probe **Spaltung**) und aus der Suspension ausgewaschen, über Benzamidin gereinigt und gesammelt (Probe **GlyR $\beta$ loop**). Alle Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und Proteine mittels Coomassie Brilliant Blue-Färbung sichtbar gemacht.

Die GST-GlyRβloop Bande verschwindet hier fast vollständig. Stattdessen erscheinen eine Bande des 120 Aminosäuren langen GlyRβloop-Peptids (14 kDa) und eine dicke Bande des GST-Proteins (26 kDa). Da das GST-Protein nach dem Thrombin-Verdau weiterhin an die Beads gebunden bleibt, ließ sich das GlyRβloop-Peptid nach Thrombin-Behandlung aus der Sepharose-Säule eluieren. Ebenfalls in diesem Eluat enthaltenes Thrombin wurde über eine weitere, mit Benzamidin beladene Säule entfernt (siehe 2.5.2.5.). So konnte reines GlyRβloop-Peptid erhalten werden (**Abb. 1, Spur GlyRβloop**). Zur Immunisierung von Mäusen wurden ca. 35 mg aufgereinigtes GST-GlyRβloop Fusionsprotein zu Synaptic Systems GmbH, Göttingen geschickt. Dieses Konstrukt wurde für die Injektion gewählt, da es sich, im Gegensatz zum reinen GlyRβloop Peptid, leicht in größeren Mengen aufreinigen ließ. Außerdem konnte das Fusionsprotein ohne Detergenzien eluiert werden, was die Verträglichkeit bei Injektion in Mäusen erheblich verbessert.

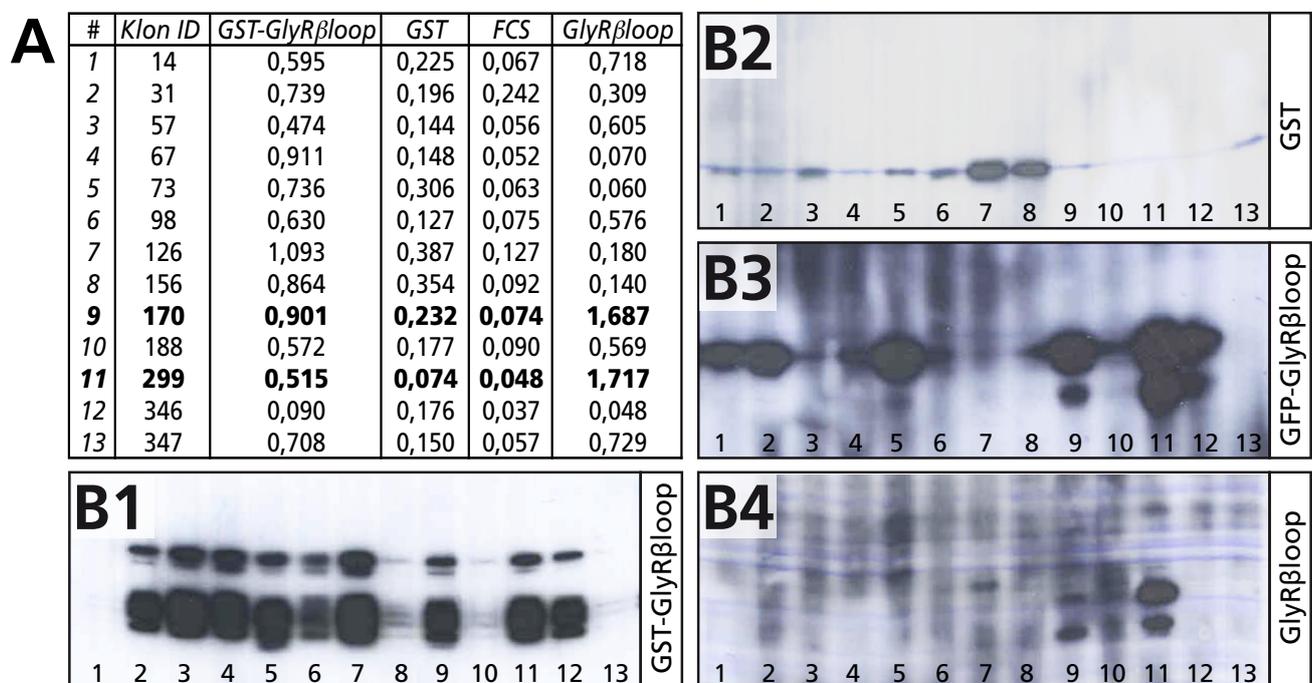
### **3.1.2. Untersuchung von Hybridoma-Mischklon-Überständen**

In Zusammenarbeit mit Synaptic Systems (Göttingen) wurden drei Mäusen je 100 µg des Antigens injiziert. Diese Immunisierung erfolgte für 17 Tage und wurde innerhalb dieses Zeitraums jeden zweiten Tag wiederholt. Anschließend wurden Zellen aus Lymphknoten von Kniebereich und Milz isoliert und mittels Polyethylenglykol (PEG) 1500 mit Ag8-Myeloma-Zellen fusioniert. Nach der Fusion wurden die so immortalisierten Zellen mit Kulturmedium verdünnt und in 24 Loch-Schalen gegeben. Dies ergab ca. 360 Mischklon-Kulturen, von denen jede aus 5 bis 10 Hybridoma-Klonen (Subklonen) bestand.

Die Kulturüberstände aller 360 Mischklone wurden über einen Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA, siehe 2.5.4.3.) auf die Anwesenheit von Antikörpern getestet. 13 positive Klone wurden über weitere ELISA-Tests spezifisch auf die Bindung an GST-GlyRβloop, GST, FCS und GlyRβloop getestet. Die Ergebnisse dieser Bindungstests sind tabellarisch in **Abb. 2 A** aufgeführt. In der ersten Spalte der Tabelle sind die Identifikationsnummern der getesteten Klone zusammengefasst. Bei den übrigen Werte handelt es sich um Fluoreszenzintensitäten, welche hier als Maß für gebundene Antikörper an das jeweils in der ersten Zeile aufgeführte Substrat diente. So banden Antikörper der Klone 170 und 299 in diesem Versuch auffällig stark an das GlyRβloop-Peptid, jedoch nur mit durchschnittlichen Werten an das GST-GlyRβloop-Fusionsprotein. Die geringe Bindungsaktivität von Antikörpern aus Klon 299 für GST und FCS weist auf eine hohes Maß an spezifischer Bindung bei geringer Hintergrundaktivität hin.

Zusätzlich wurde die Bindungsspezifität der gebildeten Antikörper mittels Western Blot-

Analysen untersucht. Hierzu wurden verschiedene Proteinlösungen über jeweils ein SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert, und durch einen Mehrkammeraufsatz jede Membran mit den 13 in den ELISA-Tests positiven Überständen inkubiert (Abb. 2, B1-4). Antikörperbindungen konnten durch den Nachweis HRP-gekoppelter Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden. Die Überstände der Klone 14, 156, 188 und 347 reagierten im Blot nur sehr schwach mit gereinigtem GST-GlyR $\beta$ loop-Protein (Abb. 2 B1). Die Überstände der Klone 126 und 156 wiesen wiederum eine hohe Kreuzreaktivität mit gereinigtem GST Protein auf (Abb. 2 B2). Für einen weiteren Versuch wurde das Antigen als GFP-Fusionsprotein in HEK293T-Zellen exprimiert, und das geklärte Lysat der Kultur im Western Blot dem Antikörpertest unterzogen (Abb. 2 B3). Lediglich 5 der 13 Überstände färbten das Antigen unter diesen Bedingungen, wobei Klon 299 vermutlich eine Überfärbung von 346 zeigt.

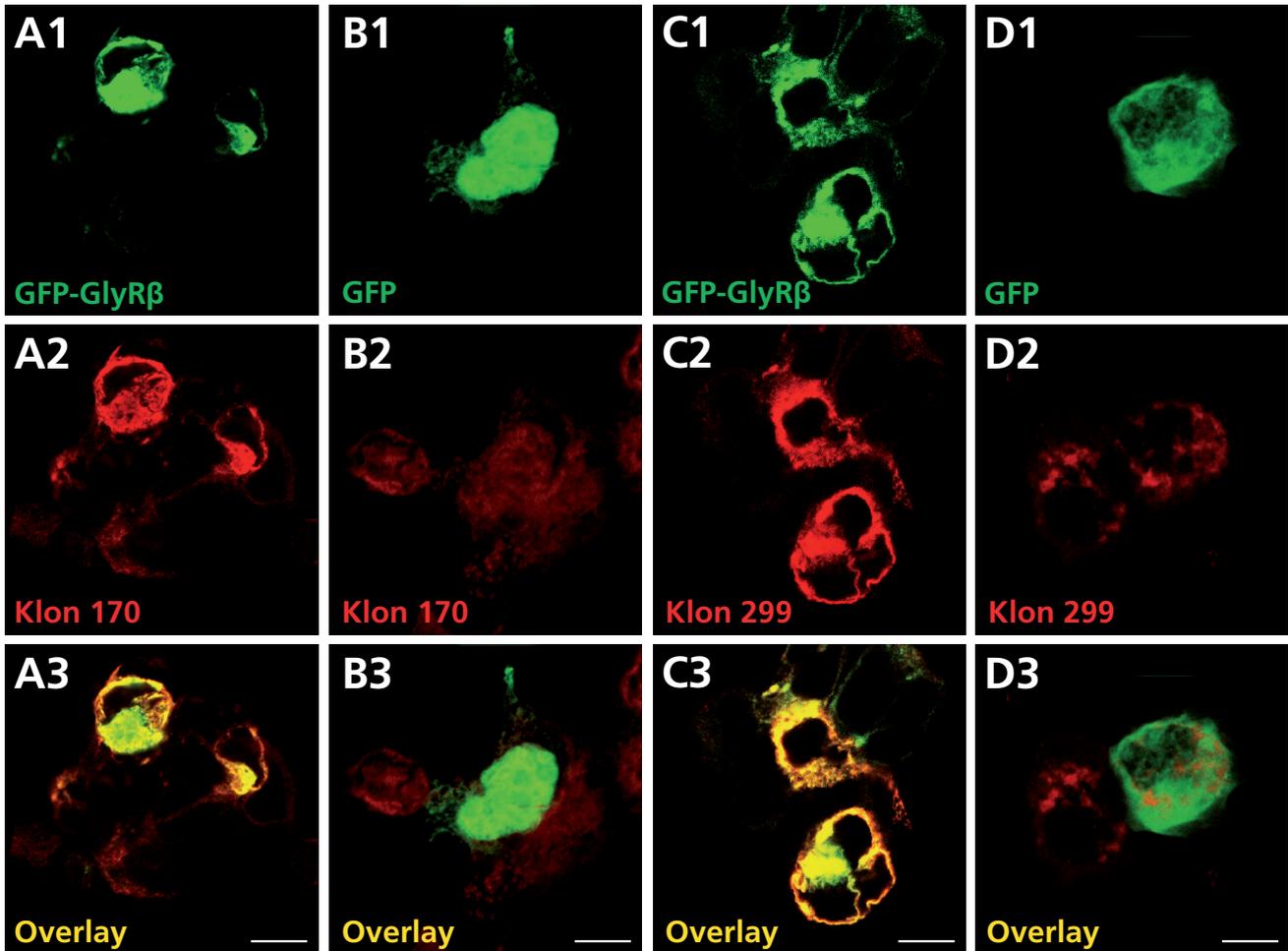


**Abb. 2: Nachweis von Antikörpern in Hybridoma-Mischklon-Überständen.** (A) ELISA Screening der Antikörper aus den Kulturüberständen 13 verschiedener Hybridoma-Mischklone. Es wurde die Bindung der Antikörper an GST-GlyR $\beta$ loop, GST, FCS und GlyR $\beta$ loop bestimmt und als relative Fluoreszenzintensitäten angegeben. (B1-4) Western Blots von gereinigtem GST-GlyR $\beta$ loop (B1), GST (B2), Zelllysate von GFP-GlyR $\beta$ loop exprimierenden HEK293T-Kulturen (B3) und gereinigtem GlyR $\beta$ loop-Peptid, gemischt mit Zelllysate von NIH3T3-Kulturen (B4). Der GlyR $\beta$ loop ist das Substrat bakterieller Proteasen; daher sind in B1, B3 und B4 mehrere Banden, vermutlich Degradationsprodukte, sichtbar. Die in (A) aufgeführten Überstände wurden in aufsteigender Zahlenfolge von links nach rechts auf die Blots aufgetragen. Gebundene Antikörper wurden über Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

In einem letzten Versuch wurde das aufgereinigte GlyR $\beta$ loop Peptid einem NIH3T3-Zellkultur Lysat beigemischt und dieses Proteingemisch wiederum über Western Blot analysiert (**Abb. 2 B4**). Allein die Überstände der Klone 170 und 299 färbten das Antigen unter diesen Bedingungen an. Die Filme in **Abb. 2 B3** und **B4** wurden sehr lang exponiert, um zu demonstrieren, dass es nicht zu Kreuzreaktivitäten mit endogenen Zellproteinen im Lysat kam. Diese Versuche demonstrieren, dass von allen Überständen die der Mischklone 170 und 299 Antikörper enthielten, welche unter allen getesteten Bedingungen spezifisch mit dem GlyR $\beta$ loop reagierten.

### **3.1.3. Immuncytochemische Tests mit Hybridoma-Überständen**

Nach den Versuchen zur Spezifität der Antikörper in ELISA und Western Blot (siehe 3.1.2.) wurden die Überstände auf transfizierten HEK293T-Zellen getestet. Diese Zelllinie exprimierten endogen keine Glycinrezeptoren. Daher wurden HEK293T-Kulturen mit einem rekombinanten GFP-GlyR $\beta$ -Konstrukt, und zu Kontrollzwecken auch mit dem leeren GFP-Vektor, transfiziert, für 16 h inkubiert und anschließend fixiert. Dieses GlyR $\beta$ -Konstrukt enthält die Sequenz der gesamten Glycinrezeptor  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\beta$ -Untereinheit ist ein integrales Membranprotein, welches in HEK293T-Zellen das ER nicht verlassen kann (siehe 1.4.3.). Dadurch reichert sich rekombinantes GFP-GlyR $\beta$ -Protein in HEK293T-Zellen stark im ER an. Hier wurden die Antikörper-enthaltenden Überstände aller 13 Mischklone mit fixierten GFP-GlyR $\beta$ - bzw. GFP-exprimierenden HEK293T-Zellen inkubiert. Durch Folgeinkubation mit einem Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper gegen Maus IgG wurden gebundene Antikörper sichtbar gemacht. Die Färbung durch Antikörper der Klone 170 und 299 (**Abb. 3**, roter Kanal) wies eine deutliche Kolo-kalisation mit dem GFP-GlyR $\beta$ -Fusionsprotein auf (**Abb. 3, A1-3** und **C1-3**), während mit Antikörpern der anderen Klone keine Kolo-kalisation beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz hierzu zeigten GFP-exprimierende Zellen kein deutliches Antikörper-Signal (**Abb. 3, B1-3** und **D1-3**). Somit konnte eine Kreuzreaktion der Antikörper mit GFP-Protein weitgehend ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass von allen getesteten Überständen allein die Antikörper der Mischklone 170 und 299 eine starke Bindung an GFP-GlyR $\beta$  aufwiesen.



**Abb. 3: Immunocytochemische Untersuchung von Mischklon-Überständen.** HEK293T-Zellen wurden mit einem GFP-GlyR $\beta$ - (A1-3, C1-3) bzw. einem GFP-Expressionsplasmid (B1-3, D1-3) transfiziert, nach 16 h fixiert und mit Überständen der Klone 170 (A1-3, B1-3) oder 299 (C1-3, D1-3) gefärbt. Das GFP-Signal ist jeweils im grünen Kanal (A1-D1), Antikörperfärbungen im roten Kanal (A2-D2) dargestellt. Eine Kolokalisation der Signale wird in Überlagerungsbildern als gelbe Färbung sichtbar (A3-D3). Die Antikörperfärbung der Klone 170 und 299 kolokalisieren mit GFP-GlyR $\beta$ , jedoch nicht mit GFP. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

Die so identifizierten Antikörper stammen aus Zellkultur-Überständen von Hybridoma-Mischklon-Kulturen. Eine Mischklon-Kultur besteht im Regelfall aus 5 - 10 verschiedenen Subklonen, also klonalen Zellen mit identischem Erbgut. Um einen monoklonalen Antikörper zu gewinnen, muss der Subklon isoliert werden, welcher die reaktiven Immunglobuline sezerniert. Daher wurden die Zellen der Mischklone 170 und 299 mehrfach vereinzelt und erneut kultiviert, um Überstände von Subklonen zu gewinnen, die einen einzigen Antikörper enthalten. Diese Überstände wurden anschließend in dem Immunfluoreszenz-Verfahren auf ihre Spezifität getestet. Hier wurden die Überstände von 12 verschiedenen monoklonalen Hybridoma-Kulturen für Immunfärbungen von HEK293T-Zellen benutzt. Keiner der Subklone aus der Vereinzlung von Mischklon 170 produzierte Antikörper, die GFP-GlyR $\beta$  spezifisch in diesen Zellen färbten

(Daten nicht gezeigt). Aus der Vereinzelung der Mischklonkultur 299 hingegen wurden mehrere Subklone isoliert, welche GlyR $\beta$ -spezifische Antikörper sezernierten. Die beste Immunfärbung GFP-GlyR $\beta$  exprimierender Zellen wurde mit dem Zellkulturüberstand von Subklon 299 E7 B4 erzielt (Abb. 4). Daher wurde der Antikörper des Klons 299 E7 B4 für alle weiteren Versuche in dieser Arbeit verwendet. Er wird im Folgenden auch als monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die Glycinrezeptor  $\beta$ -Untereinheit, kurz mGlyR $\beta$ , bezeichnet.

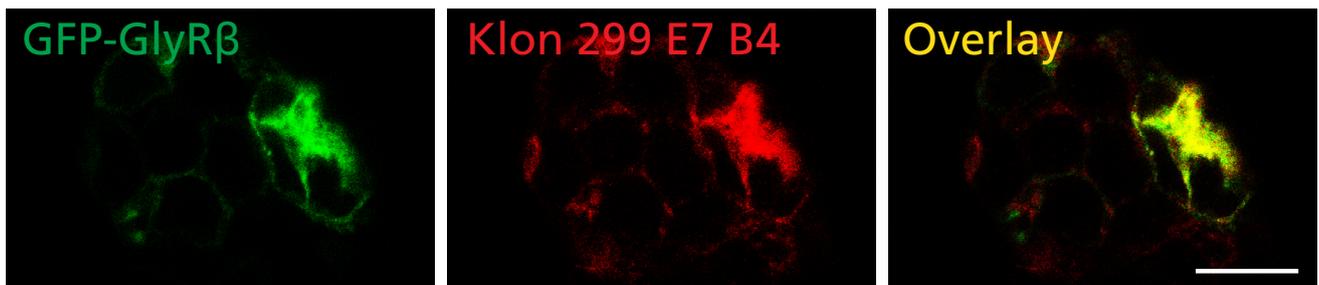


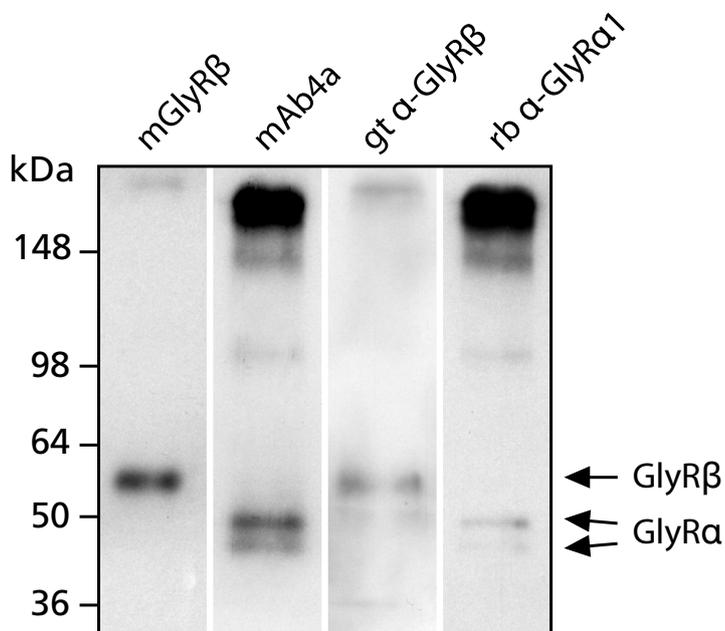
Abb. 4: Immuncytochemischer Test von Subklon 299 E7 B4. HEK293T-Zellen wurden mit einem GFP-GlyR $\beta$  Expressionsplasmid transfiziert (grüner Kanal), nach 16 h fixiert und mit Überständen des Klons 299 E7 B4 gefärbt (roter Kanal). Das Überlagerungsbild zeigt eine starke Kolokalisation von Antikörpern und GFP-GlyR $\beta$  (gelbe Färbung in Overlay). Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

### 3.1.4. Färbungen endogener Glycinrezeptoren im Western Blot

Der Antikörper mGlyR $\beta$  wurde als nächstes auf die Fähigkeit überprüft, die  $\beta$ -Untereinheit von endogenem Glycinrezeptor zu erkennen. Hierzu wurde endogenes Glycinrezeptor-Protein aus Rattenhirn über Aminostrychnin-Agarose-Säulen aufgereinigt (siehe 2.5.2.3.). Aliquots des derart gereinigten Rezeptors wurden über ein 7,5% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Einzelne Spuren dieses Blots wurden ausgeschnitten und mit unterschiedlichen Antikörperlösungen gegen Glycinrezeptoren inkubiert. Gebundene Antikörper wurden über Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

In Abb. 5 sind vier Streifen des Blots nach erfolgter Antikörperfärbung gezeigt. Die Inkubation mit mGlyR $\beta$  färbte eine Bande von ca. 58 kDa. Auf der gleichen Höhe ist auch in der goat anti-GlyR $\beta$  gefärbten Spur eine schwache Proteinbande zu beobachten. Die Antikörper mAb4a und rabbit anti-GlyR $\alpha$ 1 produzieren jeweils eine Doppelbande bei ca. 48-52 kDa sowie oberhalb von 100 kDa. GlyR $\beta$  Protein besitzt ein Molekulargewicht von 58 kDa, wohingegen  $\alpha$ -Untereinheiten Molekulargewichte von ca. 48 kDa aufweisen. Da der mGlyR $\beta$ -Antikörper

eine einzelne Proteinbande bei 58 kDa färbt, kann geschlossen werden, dass er selektiv an die  $\beta$ -Untereinheit endogener Glycinrezeptoren bindet. Antikörper gegen die  $\alpha$ -Untereinheiten erkennen Banden anderen Molekulargewichts. Es besteht also keine Kreuzreaktivität von mGlyR $\beta$  mit  $\alpha$ -Untereinheiten.



**Abb. 5:** Western Blot von gereinigtem Glycinrezeptor (GlyR). GlyR-Komplexe wurden aus Rückenmark von Ratten aufgereinigt, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. mGlyR $\beta$ -Antikörper erkennt eine einzelne Proteinbande von ca. 58kDa, ebenso wie ein polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit (gt  $\alpha$ -GlyR $\beta$ , Santa Cruz Biotech. Inc.). Der monoklonale Antikörper mAb4a und ein GlyR $\alpha$ 1- spezifischer polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (rb  $\alpha$ -GlyR $\alpha$ 1) binden bevorzugt Banden mit geringerem Molekulargewicht (48 - 52 kD) sowie GlyR-Multimere > 100 kDa.

### 3.1.5. Identifikation der Antikörper-Bindestelle von mGlyR $\beta$

Zur Herstellung des Antikörpers wurden Mäuse mit der cytoplasmatischen Schleife der GlyR $\beta$ -Untereinheit immunisiert. Das Epitop des neuen Antikörpers muss demnach innerhalb dieser 120 AS langen Sequenz liegen. Um die Bindestelle genauer zu lokalisieren, wurden verkürzte GST-GlyR $\beta$ loop-Konstrukte in Bakterien exprimiert und die geklärten Lysate im Western Blot auf die Bindung von mGlyR $\beta$  getestet. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in **Abb. 6** (oberer Bildteil) gezeigt. Hierbei wurde die Nummerierung der Aminosäuren aus der Sequenz des gesamten GlyR $\beta$  übernommen, wobei die cytoplasmatische Schleife von 120 AS den Positionen 336 - 455 entspricht. Der neue mGlyR $\beta$ -Antikörper bindet im Western Blot an das 40 kDa Konstrukt, welches die kompletten 120 AS enthält (GST-GlyR $\beta$ <sub>336-455</sub>), sowie an zwei weitere Teilkonstrukte von 31 und 29 kDa, welche lediglich die ersten 35 bzw. 20 Aminosäuren des Immunisierungspeptids enthalten (GST-GlyR $\beta$ <sub>336-370</sub> bzw. GST-GlyR $\beta$ <sub>336-355</sub>). Rekombinante GST-Fusionen, denen die ersten 15 Aminosäuren der Schleifensequenz (GST-GlyR $\beta$ <sub>351-455</sub>), oder die ersten 42 und die letzten 27 AS (GST-GlyR $\beta$ <sub>378-426</sub>) fehlen, wurden ebenso wie die

Negativkontrolle (GST) nicht von mGlyR $\beta$  erkannt. Im Anschluss an diese mGlyR $\beta$ -Färbung wurde die Membran stringent gewaschen („gestrippt“) und mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen GST inkubiert. Diese Färbung diente als Ladekontrolle, um die aufgetragenen GST- bzw. GST-Fusionsproteine sichtbar zu machen (Abb. 6, unterer Bildteil). Die Ergebnisse belegen, dass die Bindungsstelle des mGlyR $\beta$  Antikörpers innerhalb der ersten 20 Aminosäuren der großen Glycinrezeptorschleife liegt.

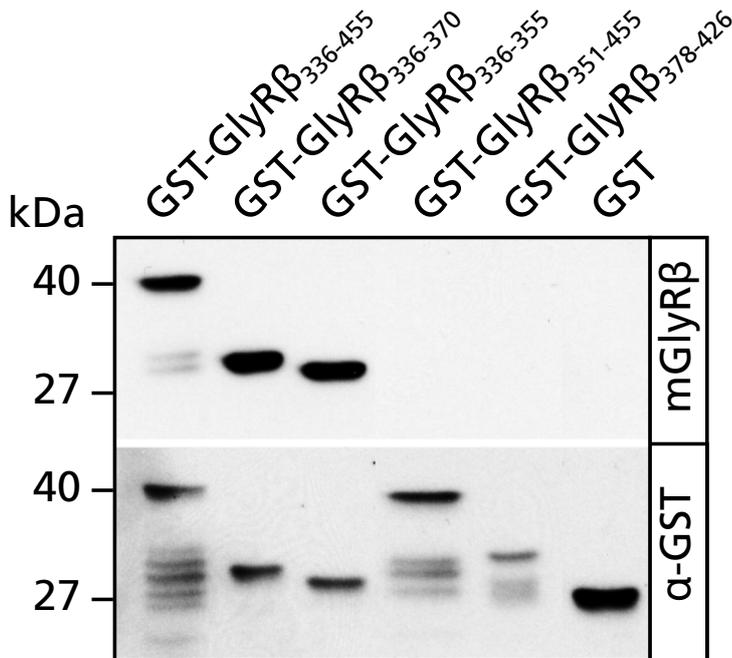


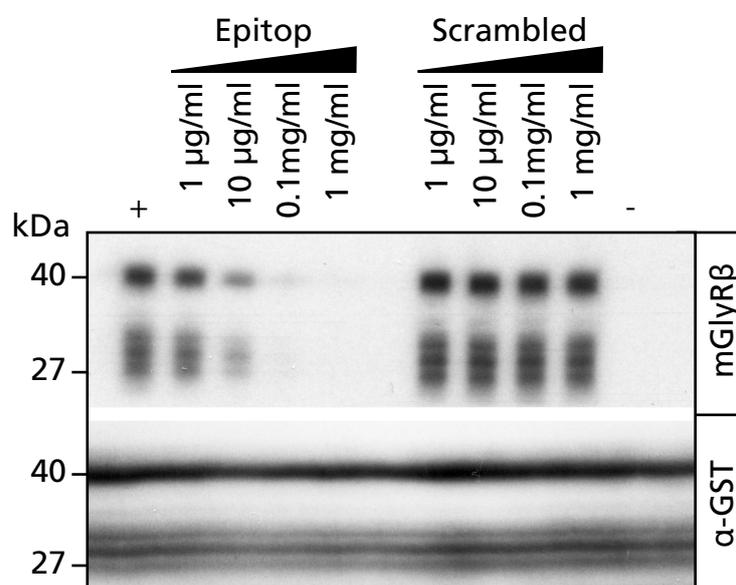
Abb. 6: Western Blot zur Identifikation des mGlyR $\beta$ -Epitops. Verkürzte Konstrukte des GlyR $\beta$ loop wurden als GST-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert, die geklärten Bakterienlysate über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf mGlyR $\beta$ -Bindung überprüft (oberer Bildteil). Die gleiche Membran wurde nach Entfärbung mit einem GST-spezifischen Antikörper auf die Anwesenheit von Fusionsproteinen überprüft (unterer Bildteil). Das Epitop liegt innerhalb der ersten 20 AS der großen cytoplasmatischen Glycinrezeptorschleife.

### 3.1.6. Hemmung der mGlyR $\beta$ -Bindung durch ein Epitop-Peptid

Im vorausgegangenen Versuch (siehe 3.1.5.) wurde über die Detektion trunkierter GlyR $\beta$ -Konstrukte gezeigt, dass die Bindestelle des mGlyR $\beta$ -Antikörpers innerhalb der ersten 20 AS des GlyR $\beta$ loop liegt. Dies wurde nun in einem Umkehr-Experiment bestätigt. Hierzu wurde ein 20 AS langes Peptid synthetisiert, welches in seiner Sequenz exakt der des Epitops ( $NH_2$ -KRVEAEKARIAKAEQADGKG-COOH) entspricht. Zusätzlich wurde noch ein zweites Peptid der gleichen Größe, bestehend aus den gleichen Aminosäuren, synthetisiert, dessen Sequenz jedoch durch zufällige Anordnung der AS durcheinandergebracht (engl. *scrambled*) wurde. Die gesamte Sequenz des Loops wurde als GST-GlyR $\beta$ <sub>336-455</sub> Fusionsprotein in Bakterien exprimiert, das geklärte Lysat über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Ein Mehrkammeraufsatz ermöglichte die gleichzeitige Inkubation der Membran mit unterschiedlich vorbehandelten mGlyR $\beta$ -Antikörperlösungen. Vier Aliquots des verdünnten Antikörpers wurden

mit unterschiedlichen Konzentrationen des Epitop-Peptids (1000, 100, 10 und 1 µg/ml) für 1 h bei RT vorinkubiert. Vier weitere Proben des Antikörpers wurden mit gleichen Konzentrationen des Scrambled-Peptids vorbehandelt. Anschließend wurden die vorbehandelten Antikörperlösungen mit der Membran inkubiert und gebundene Antikörper über Chemolumineszenz detektiert. Des Weiteren wurden auch eine Positivkontrolle bestehend aus unbehandelter Antikörperlösung (+) und eine mGlyRβ-freie Lösung als Negativkontrolle (-) auf dem Blot getestet. Bereits die Zugabe von 1 µg Epitop-Peptid / ml reduzierte die Antikörperbindung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ein Anstieg der Epitop-Peptid-Konzentration in den Lösungen führt zu einer weiteren Reduktion der Bandenintensitäten auf der Membran (**Abb. 7**, oberer Bildteil, Spuren: **Epitop** und +). Die Vorinkubation des Antikörpers mit dem Scrambled-Peptid hatte keinen Einfluß auf dessen Bindungseigenschaften im Western Blot (**Abb. 7**, oberer Bildteil, Spuren: **Scrambled**).

Durch Inkubation der Membran mit einem GST-spezifischen, Peroxidase-gekoppelten Antikörper wurde das Fusionsprotein angefärbt. Dies machte die gleichmäßige Verteilung des 40 kDa Proteins und dessen Degradationsprodukten (27-34 kDa) über den gesamten Blot sichtbar (**Abb. 7**, unterer Bildteil). Das 20 AS lange Epitop-Peptid ist demnach ausreichend, um die Bindestellen des mGlyRβ Antikörpers abzusättigen und die Antigen-Erkennung im Western Blot zu unterdrücken.



**Abb. 7: Hemmung der mGlyRβ Bindung durch Epitop-Peptid.** GST-GlyRβloop wurde in *E.coli* exprimiert, die geklärten Bakterienlysate über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mittels eines Mehrkammeraufsatzes mit Proben von mGlyRβ inkubiert. Diese wurden zuvor mit ansteigenden Mengen des Epitop-Peptids bzw. des Scrambled-Peptids präinkubiert. mGlyRβ erkennt eine Proteinbande von ca. 40 kDa und deren Degradationsprodukte (35-27 kDa; oberer Bildteil). Die Membran wurde nach Entfärbung mit einem GST-spezifischen Antikörper auf die Anwesenheit von GST-GlyRβloop überprüft (unterer Bildteil). Präinkubation des mGlyRβ Antikörpers mit dem Epitop-Peptid verhindert im Gegensatz zum Scrambled-Peptid die Bindung an den GlyRβloop. Als Positivkontrolle wurde unbehandelte Antikörperlösung (+), als Negativkontrolle eine Lösung ohne Antikörper (-) eingesetzt.

### 3.1.7. Spezifität des mGlyR $\beta$ Antikörpers in immuncytochemischen Experimenten

In den oben beschriebenen Experimenten band mGlyR $\beta$  ausschließlich an die  $\beta$ -Untereinheit von Glycinrezeptoren. Antikörper-Antigen-Bindungseigenschaften können jedoch je nach Versuchsbedingungen variieren. Daher wurde in einem separaten Versuch die Untereinheiten-Spezifität des Antikörpers in Zellfärbungsversuchen erneut überprüft. HEK293T-Zellen wurden zu diesem Zweck mit cDNA kodierend für die Glycinrezeptor-Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\beta$  transfiziert, nach 16 h fixiert und anschließend mit mGlyR $\beta$  und mAb4a gefärbt. Die Bindung dieser monoklonalen Antikörper wurde über Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen. Für den monoklonalen Antikörper mAb4a ist bekannt, dass er in immuncytochemischen Versuchen alle GlyR-Untereinheiten bindet (Becker *et al.*, 1992; Heinze *et al.*, 2007). Daher wurde er hier als Kontrolle für die Expression von GlyR-Protein nach Transfektion verwendet.

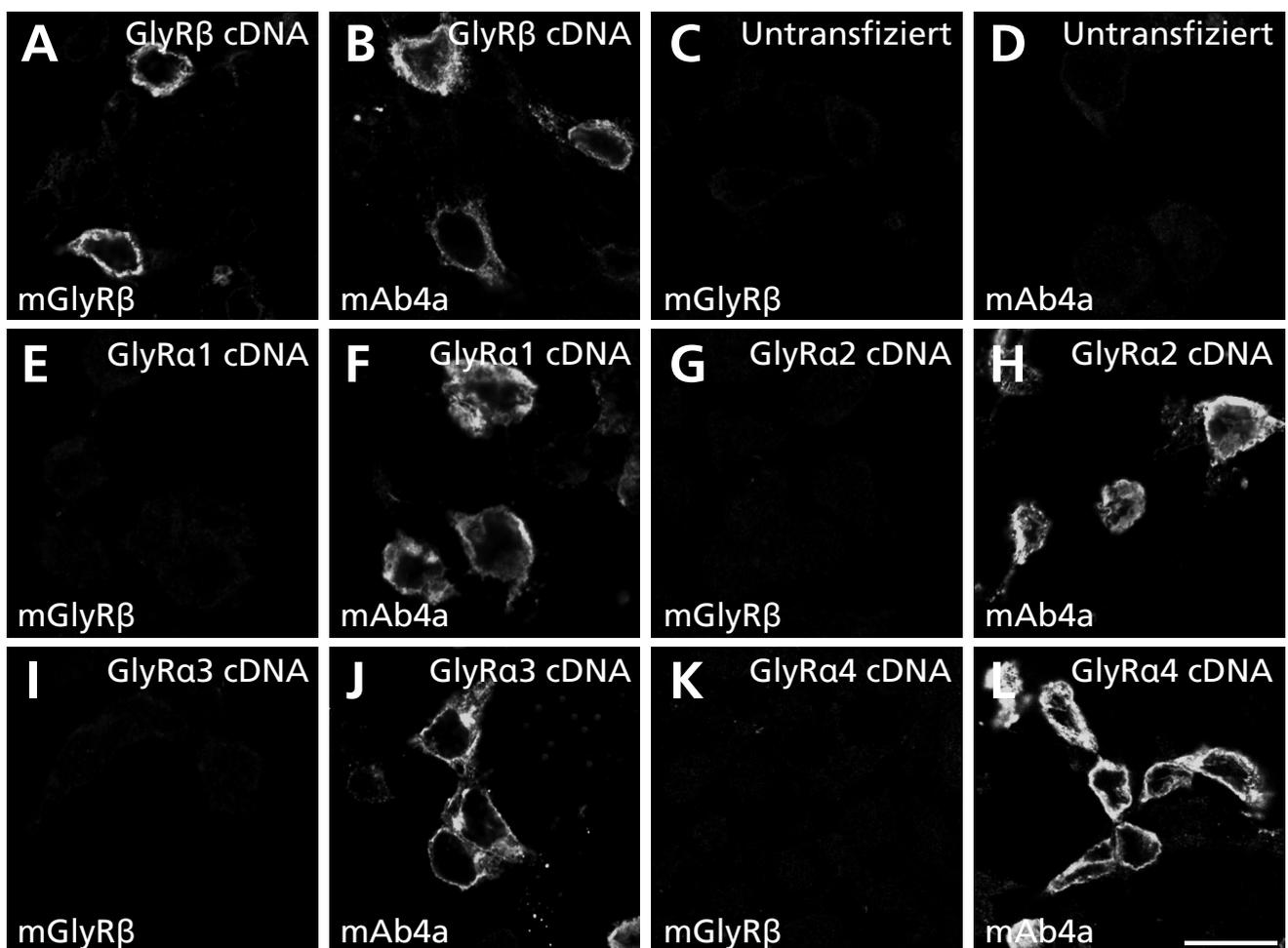


Abb. 8: mGlyR $\beta$  bindet spezifisch an die  $\beta$ -Untereinheit von Glycinrezeptoren in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit gleichen Mengen GlyR $\beta$ - (A,B) oder den verschiedenen GlyR $\alpha$ - (E-L) cDNAs transfiziert, nach 16 h fixiert und mit mGlyR $\beta$ - bzw. mAb4a-Antikörpern gefärbt. mGlyR $\beta$  färbt nur Zellen, die GlyR $\beta$ -Untereinheiten exprimieren (A, C, E, G, I, K), während mAb4a alle exprimierten GlyR-Untereinheiten anfärbt (B, F, H, J, L) Maßstabsbalken: 15  $\mu$ m.

In **Abb. 8** sind die Ergebnisse der an transfizierten HEK293T-Zellen durchgeführten Färbungen dargestellt. Exprimiertes GlyR $\beta$ -Protein wird, wie bereits beschrieben, im ER angereichert und ist dort mit mGlyR $\beta$  und mAb4a detektierbar (**Abb. 8 A und B**). Im Gegensatz hierzu sinkt das mGlyR $\beta$ -Antikörper-Signal in Zellen, die GlyR $\alpha$ 1-4 exprimieren (**Abb. 8 E, G, I, K**), auf ein Hintergrundniveau, welches vergleichbar mit nicht-transfizierten Zellen (**Abb. 8 C**) ist. Die Anwesenheit von GlyR-Protein in den verschiedenen Zell-Chargen wurde durch mAb4a-Färbung belegt (**Abb. 8 B, F, H, J, L**); mit untransfizierten Zellen produziert dieser Antikörper kein signifikantes Signal (**Abb. 8 D**). Dies macht deutlich, dass es sich bei den gezeigten mAb4a-Signalen um spezifische Bindung an GlyR-Protein handelt. Der neue Antikörper gegen GlyR $\beta$  bindet auch in transfizierten Zellen ausschließlich an die  $\beta$ -Untereinheit und ist somit grundsätzlich geeignet für immunocytochemische Experimente.

### **3.1.8. Färbung von synaptisch lokalisiertem GlyR $\beta$ in Neuronenkulturen**

Im Hirnstamm und im Rückenmark finden sich die höchsten Konzentrationen von Glycinrezeptoren. Färbungen synaptischer Proteine wie Gephyrin oder Glycinrezeptoren zeigen in spinalen Neuronenkulturen ein vorwiegend punktförmiges Verteilungsmuster entlang von Dendriten; diese entsprechen einzelnen inhibitorischen Synapsen (Kirsch et al., 1993). Mit dem mGlyR $\beta$ -Antikörper konnte nun erstmals die Verteilung der GlyR $\beta$ -Untereinheit in Neuronen untersucht werden (**Abb. 9 A**). Hierzu wurden primäre Neuronenkulturen aus Rattenrückenmark 21 Tage kultiviert, fixiert und mit polyklonalen Antikörpern gegen VIAAT (**Abb. 16C, D**) bzw. Gephyrin (**Abb. 9 F, G**) und mGlyR $\beta$  gefärbt (**Abb. 9 A, B, E, D, G**). Das Signal der GlyR $\beta$ -Untereinheit war in diese Neuronen in punktförmigen Clustern von ca. 0,5  $\mu$ m Durchmesser verteilt und zum größten Teil VIAAT-positiven Terminalien appositioniert (**Abb. 9 B-D**). Die Doppelfärbung mit Gephyrin-Antikörpern zeigt eine starke Kolokalisation von GlyR $\beta$ -Immunreaktivität mit Gephyrin (**Abb. 9 E-G**). Es ist nur wenig diffuse Färbung von GlyR $\beta$  in den Neuronen zu beobachten (**Abb. 9 A**). Vielmehr liegt GlyR $\beta$  an VIAAT-positiven, inhibitorischen Synapsen angereichert vor, wo er mit dem GlyR-Bindeprotein Gephyrin kolokalisiert. Form und Verteilung des mGlyR $\beta$ -Antikörpersignals sprechen demnach für eine spezifische Färbung des endogenen Glycinrezeptors in primären Rückenmarksneuronen.

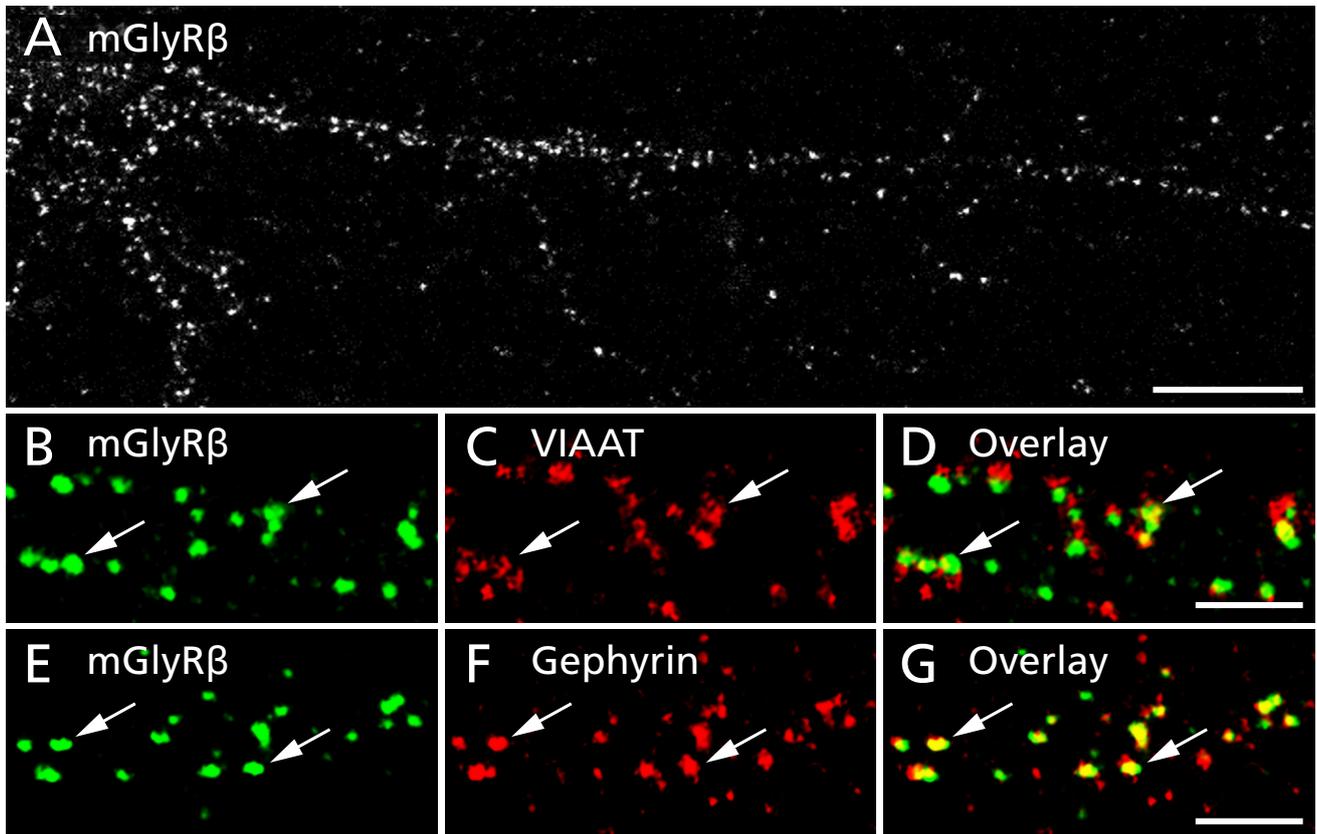


Abb. 9: Verteilung von GlyR $\beta$  in kultivierten Rückenmarksneuronen. Der neue mGlyR $\beta$ -Antikörper produziert immunreaktive Punkte entlang von Dendriten (A). Doppelfärbungen mit VIAAT zeigten die Apposition von mGlyR $\beta$ -Punkten an inhibitorische Präsynapsen (B-D). Mittels Antikörperfärbung detektiertes Gephyrin kolokalisiert mit den Signalen des mGlyR $\beta$ -Antikörpers (E-G). Pfeile zeigen Apposition bzw. Kolokalisation an. Maßstabsbalken: A= 15  $\mu$ m; D, G= 3  $\mu$ m.

### 3.1.9. Färbung der GlyR $\beta$ -Untereinheit in Hirnschnitten

Als nächstes wurde die Spezifität des Antikörpers in immunhistochemischen Färbungen von Mäusegehirn- und Rückenmarks-Kryoschnitten überprüft. In **Abb. 10 A1** ist die mGlyR $\beta$  Färbung eines 14  $\mu$ m dicken Sagitalschnitts durch das Rückenmark einer adulten Maus gezeigt. Der Antikörper produzierte punktförmige, über den Schnitt verteilte Signale. Die Punkte waren in ihrer Größe, Form und Intensität mit den Färbungen auf Neuronenkulturen vergleichbar. Um diese Signale nun auf spezifische Bindung des Antikörpers an GlyR $\beta$  Protein zurückführen zu können, wurden für weitere Färbungen die Antikörperlösungen mit je 0,1 mg/ml Epitop- oder Scrambled-Peptid präinkubiert, wie unter 3.1.6. beschrieben. Die Zugabe des Scrambled-Peptids hatte keinen Einfluß auf Intensität oder Verteilung der mGlyR $\beta$ -Färbung (**A3**), verglichen zur unbehandelten Kontrolle (**A1**). Im Gegensatz hierzu verhinderte die Präinkubation mit dem Epitop-Peptid jegliche Bindung des Antikörpers in Rückenmarks-Schnitten (**A2**). Die bei der Antikörperfärbung entstehenden Signale sind also auf spezifische Bindung an GlyR $\beta$ -Protein zurückzuführen. Eine Wiederholung dieses Experiments mit Hirnstamm-Kryoschnitten führte zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Versuch wurden sagittale Hirnschnitte von Mäusen angefertigt, welche GFP-Gephyrin transgen unter Kontrolle des Thy1-Promotors exprimieren (von S. Reddy-Alla freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Das Fluoreszenzsignal des rekombinanten GFP-Gephyrin-Proteins diente als Marker für inhibitorische Synapsen. Da Gephyrin GlyRs über GlyR $\beta$  an der Synapse verankert (Meyer *et al.*, 1995; Dumoulin *et al.*, 2010), sollten alle GlyR $\beta$ -Anreicherungen mit GFP-Gephyrin kolokalisieren. Hirnstamm-Kryoschnitte dieser transgenen Mauslinie wurden mit mGlyR $\beta$  gefärbt. Ein optischer Schnitt dieser Sektion ist in **Abb. 10 B1-3** gezeigt. Wie erwartet weist GFP-Gephyrin in punktförmigen Clustern eine Kolokalisation mit dem Signal der mGlyR $\beta$ -Färbung auf. Dies ist ein klares Indiz für die synaptische Lokalisation von GlyR $\beta$  und dessen ubiquitäre Bindung an Gephyrin im Hirnstamm. Um diesen Schluss zu festigen, wurde endogenes Gephyrin in Hirnstamm-Kryoschnitten von WT-Mäusen mittels eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers zusammen mit GlyR $\beta$  gefärbt. In optischen Schnitten dieser Färbung (**Abb. 10 C1-3**) zeigte sich ein ähnliches Protein-Verteilungsmuster wie in Geweben transgener Mäuse. GlyR $\beta$  kolokalisierte in punktförmigen Clustern mit endogenem Gephyrin. Außerdem wurde noch eine Doppelfärbung vergleichbarer Schnitte mit mGlyR $\beta$  und einem polyklonalen Antikörper gegen VIAAT durchgeführt. Unter 3.1.8 wurde bereits gezeigt, dass dieser Transporter in Neuronenkulturen appositioniert zu mGlyR $\beta$  Punkten vorliegt. Daher wurden von den histologischen Schnitten keine konfokalen Einzelschnitte, sondern kollabierte Stapel optischer Sektionen aufgenommen (**Abb. 10 D1-3**). Auf diesen Bildern wird deutlich, dass der größte Teil von mGlyR $\beta$ -Punkten mit dem VIAAT-Signal überlagert vorliegt. Der neue Antikörper produziert demnach auch in histochemischen Versuchen an Gewebsschnitten spezifische Färbungen der  $\beta$ -Untereinheit von Glycinrezeptoren. Die Hirnstammschnitte von Mäusen belegen überdies, dass GlyR $\beta$  an der inhibitorischen Postsynapse lokalisiert und mit Gephyrin geclustert ist.

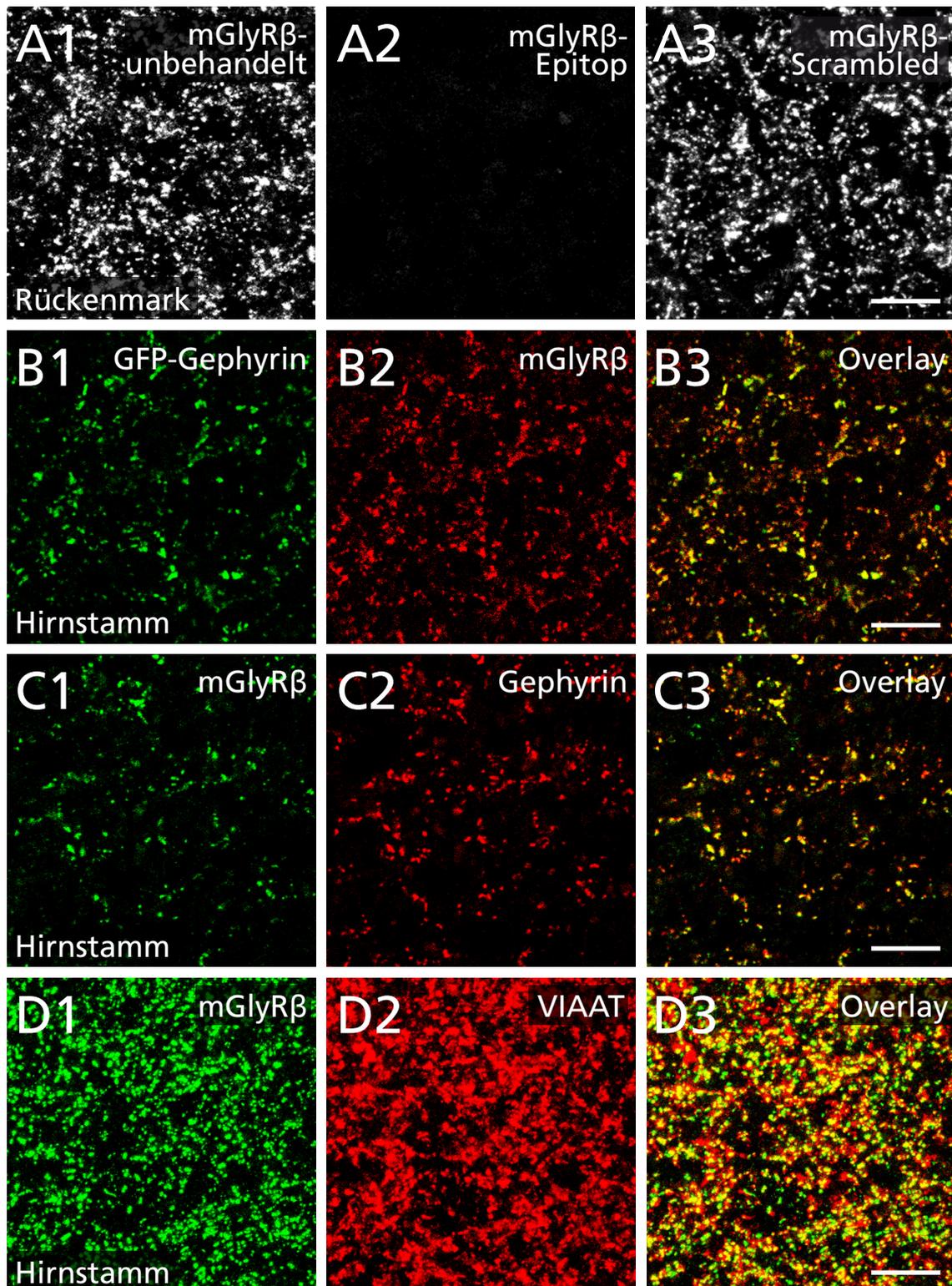
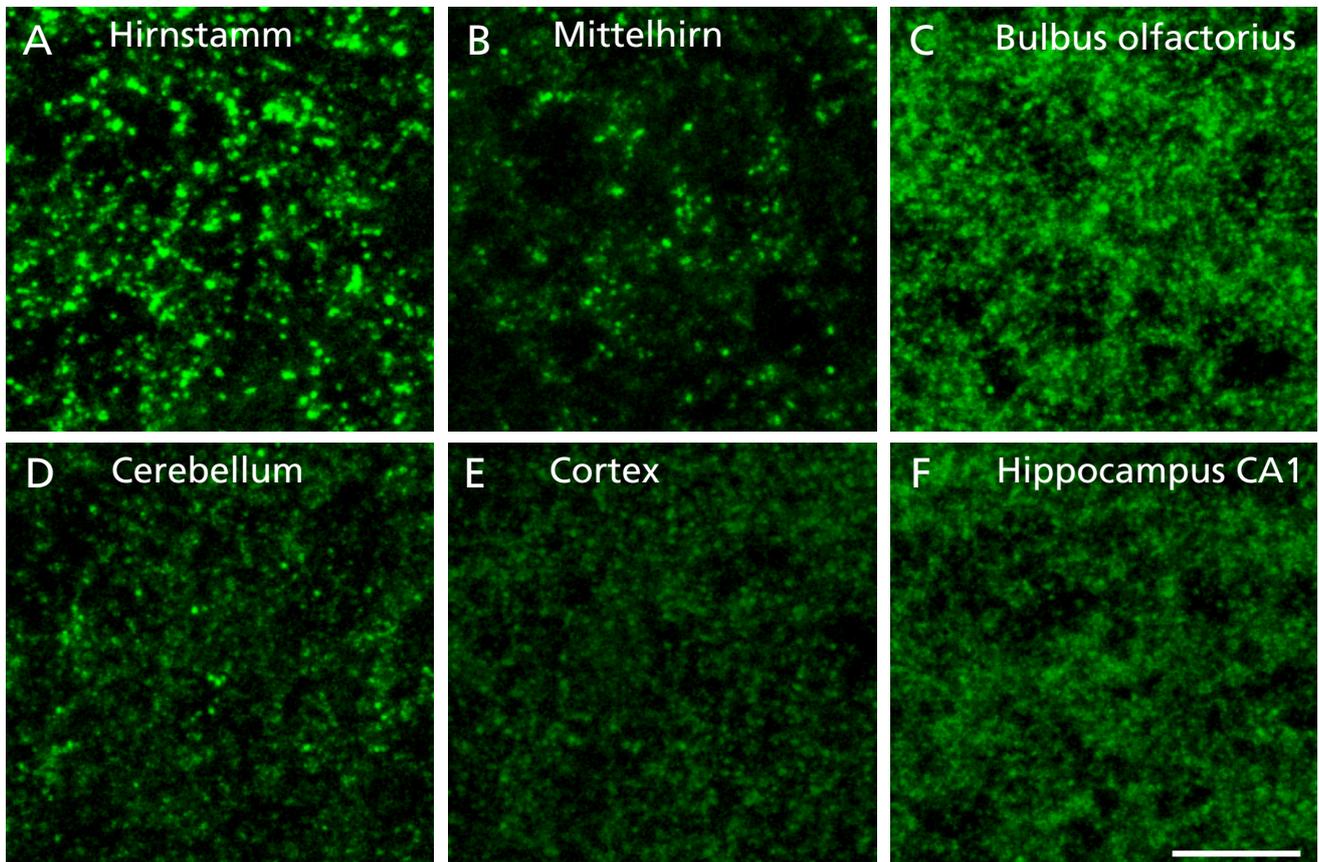


Abb. 10: Spezifische GlyR $\beta$ -Immunfärbungen von Rückenmark- und Hirnstamm-Kryoschnitten aus Mäusen. Präinkubation des mGlyR $\beta$  Antikörpers mit der Epitop-Peptidsequenz, aber nicht dem Scrambled-Peptid verhinderte jegliche Immunfärbung (A1-3). In Schnitten aus dem Hirnstamm einer GFP-Gephyrin exprimierenden Mauslinie kolokalisiert die mGlyR $\beta$ -Färbung mit GFP-Gephyrin (B1-3). Im Hirnstamm von WT-Mäusen produzierte die Doppelfärbung mit mGlyR $\beta$  und einem polyklonalen Gephyrin-spezifischen Antikörper aus Kaninchen eine vergleichbare Anzahl kolokalisierender Cluster (C1-3). Kofärbungen von VIAAT und mGlyR $\beta$  zeigten, dass die große Mehrheit der mGlyR $\beta$  Signale gegenüber inhibitorischen Präsynapsen lokalisiert ist (D1-3). Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

### 3.1.10. Verteilung der GlyR $\beta$ -Untereinheit im Mausgehirn

Inspektion von Sagittalschnitten des Mausgehirns nach mGlyR $\beta$ -Färbung ergab, dass sich die Fluoreszenzsignale zwischen den unterschiedlichen Hirnregionen in Form und Verteilung stark unterscheiden. Repräsentative Bilder von verschiedenen Regionen eines sagittalen Hirnschnitts sind in **Abb. 11** gezeigt.



**Abb. 11: Verteilung von GlyR $\beta$  im Mausgehirn.** Gezeigt sind kollabierte Stapel optischer Sektionen aus Kryoschnitten von Mausgehirn, die mit dem mGlyR $\beta$ -Antikörper gefärbt wurden. Die jeweils dargestellte Hirnregion ist angegeben. Sowohl die Intensität als auch die Form des Antikörpersignals (diffus bis punktförmig) unterscheiden sich deutlich in den verschiedenen Regionen. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

Im Hirnstamm ist die GlyR $\beta$ -Immunreaktivität in kräftig gefärbten Punkten konzentriert (**Abb. 11 A**). Im Mittelhirn hingegen ist das Antikörpersignal deutlich schwächer (**Abb. 11 B**). Gefärbte Punkte besitzen hier geringere Intensität und sind weniger dicht verteilt als im Hirnstamm. Im Bulbus olfactorius ist das Signal hauptsächlich diffus verteilt und es sind nur vereinzelt Punkte zu erkennen, welche sich aufgrund des starken diffusen Signals jedoch nur schwer ausmachen lassen (**Abb. 11 C**). Einige deutlich immunreaktive Punkte sind im Cerebellum über der nur leicht diffusen Hintergrundfärbung gut zu erkennen (**Abb. 11 D**), während im

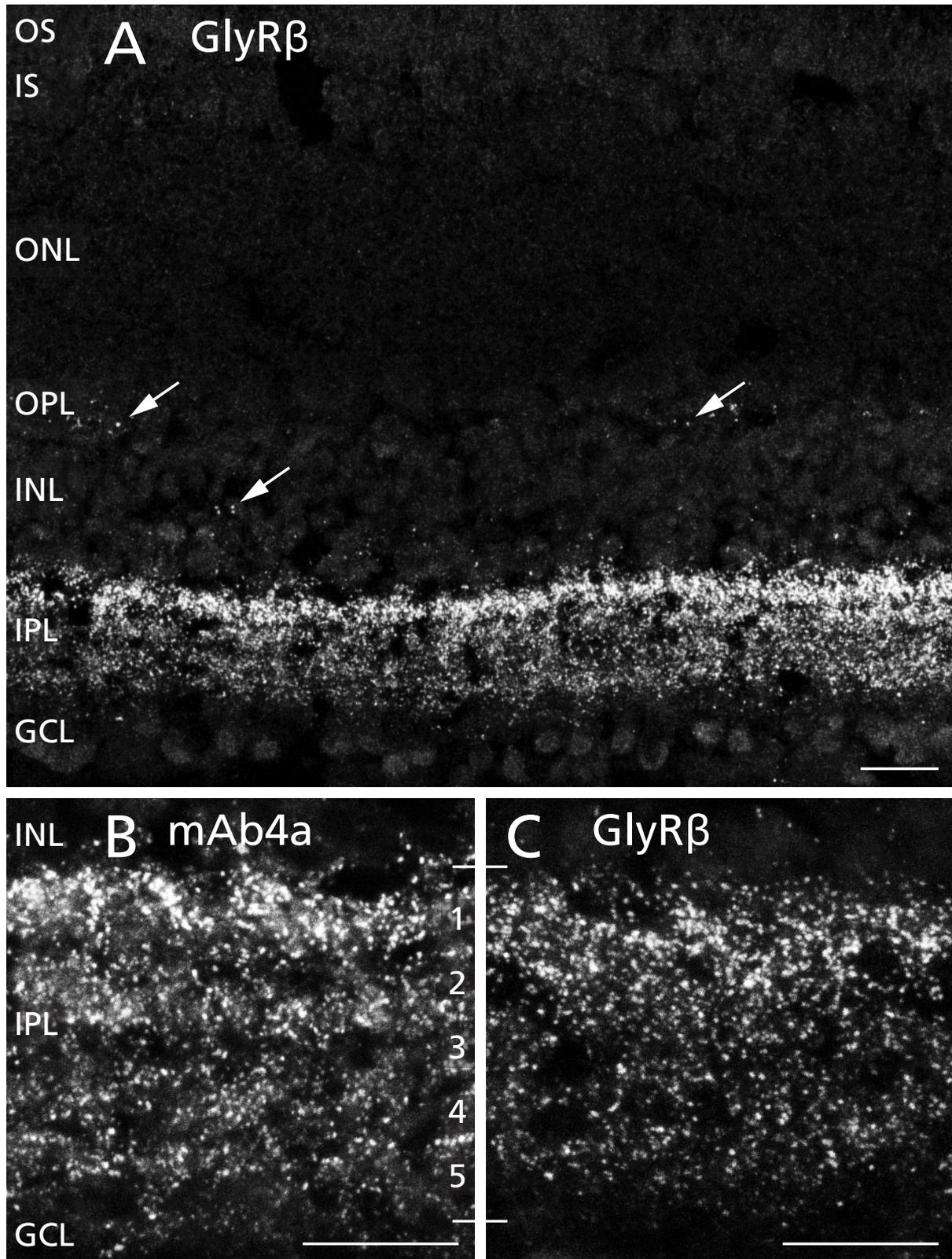
Cortex (**Abb. 11 E**) nur ein minimales und im Hippocampus (**Abb. 11 F**) nur ein schwach diffuses Signal gefunden wurden, jedoch keine synaptischen Punkte sichtbar waren.

### **3.2. Immunhistochemische Untersuchungen an der Mausretina**

Die Retina ist ein besonders gut untersuchter Teil des Zentralnervensystems, in welchem, wie im Gehirn, GABA und Glycin die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter sind. Glycinrezeptoren sind in der inneren plexiformen Schicht (IPL<sup>1</sup>) stark angereichert (Pow und Hendrickson, 1999). Die Verteilung von GlyR $\beta$  innerhalb der Retina, und insbesondere der IPL, wurde in dieser Arbeit erstmals mittels Antikörperfärbung untersucht.

#### **3.2.1. Lokalisation von GlyR $\beta$ in der Retina von Mäusen**

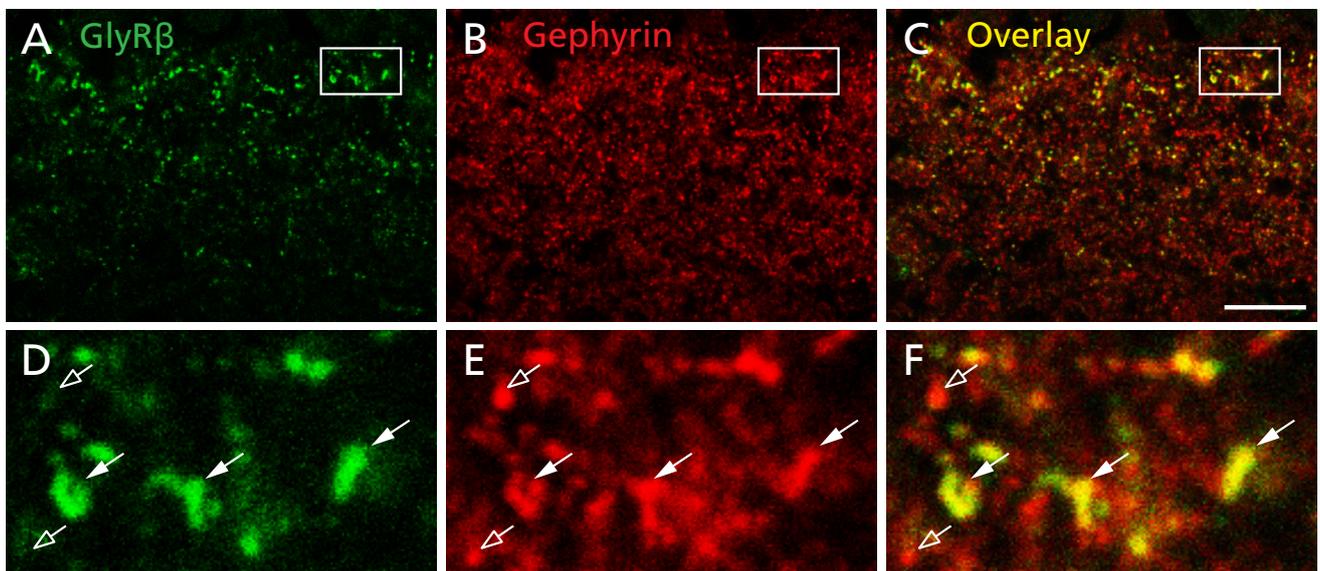
Um erste Erkenntnisse über die Anwesenheit und Verteilung von GlyR $\beta$  zu erhalten, wurden Kryoschnitte von Retina aus WT-Mäusen mittels Antikörperfärbungen untersucht. In **Abb. 12A** ist ein Querschnitt durch WT-Mausretina gezeigt, der mit dem mGlyR $\beta$ -Antikörper gefärbt wurde. Die GlyR $\beta$ -Immunreaktivität ist, ähnlich wie in Hirnschnitten, in punktförmigen Strukturen lokalisiert. Die höchste Dichte immunpositiver Punkte ist in der IPL zu beobachten, wobei sie von Stratum 1 hin zu Stratum 5 geringer wird. Vereinzelt sind auch punktförmige GlyR $\beta$ -Signale in der äußeren plexiformen Schicht (OPL<sup>2</sup>) und auch auf Amakrinzellkörpern in der proximalen inneren Zellkörperschicht (INL<sup>3</sup>) erkennbar (**A; Pfeile**). Vom Antikörper mAb4a ist bekannt, dass er in immunhistochemischen Färbungen an alle Glycinrezeptor-Untereinheiten (GlyR $\alpha$ 1-4,  $\beta$ ) bindet (Kirsch *et al.*, 1993, Heinze *et al.*, 2007). Vergrößerte Abbildungen zeigen, dass das Verteilungsmuster von GlyR $\beta$  vergleichbar mit Färbungen durch mAb4a ist (**Abb. 12 B, C**). Dies lässt vermuten, dass die meisten oder alle GlyRs in der Retina die  $\beta$ -Untereinheit enthalten.



**Abb. 12: Immunfärbung von GlyR $\beta$  in der Mausretina.** Gezeigt sind Kryoschnitte von Mausretina. Definierte anatomischen Schichten sind am linken Bildrand angegeben (OS: äußere Photorezeptorsegmente; IS: innere Photorezeptorsegmente; ONL: äußere Zellkörperschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Zellkörperschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglion-Zellschicht). Übersichtsaufnahme der GlyR $\beta$ -gefärbten Mausretina (A). Einzelne GlyR $\beta$  Signale außerhalb der IPL sind mit Pfeilen markiert. Vergrößerungen der IPL aus Mausretina, gefärbt mit mAb4a (B) oder mGlyR $\beta$  (C). Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

### 3.2.2. Kolokalisation von GlyR $\beta$ mit Gephyrin

Um zu überprüfen, ob das punktförmig angereicherte GlyR $\beta$ -Protein an inhibitorischen Postsynapsen lokalisiert und hier über Gephyrin geclustert ist, wurden Retinaschnitte einer Doppelfärbung mit mGlyR $\beta$  und polyklonalen Antikörpern gegen Gephyrin unterzogen. In **Abb. 13 A, B und C** ist die IPL nach Immunfärbung gezeigt. Die markierten Bereiche sind in **Abb. 13 D, E und F** vergrößert gezeigt. Fast alle GlyR $\beta$ -Cluster kolokalisieren mit Gephyrin (97,3%  $\pm$ 3,1%, n=3). Des weiteren wird deutlich, dass das Gephyrinsignal in der IPL eine höhere Dichte aufweist als GlyR $\beta$ . Viele GlyR $\beta$  Punkte sind mit Gephyrinsignalen überlagert. Es sind etliche weitere Gephyrinpunkte zu erkennen, die nicht mit GlyR $\beta$ -Signal zusammenfallen. Diese entsprechen wahrscheinlich GABAergen Synapsen (Haverkamp & Wässle, 2000; Fischer *et al.*, 2000).



**Abb. 13:** GlyR $\beta$  ist in der IPL mit Gephyrin kolokalisiert. Mausretina wurde mit mGlyR $\beta$  und einem polyklonalen Gephyrin-Antikörper doppelgefärbt (A-F). Die in A-C markierten Bereiche sind in D-F vergrößert dargestellt. Kolokalisationen sind in Überlagerungsbildern durch gelbe Färbung zu erkennen und exemplarisch mit gefüllten Pfeilen gekennzeichnet; nicht-kolokalisierende Gephyrin-Punkte sind mit hohlen Pfeilen markiert (D-F). Maßstabsbalken: 15  $\mu$ m.

### 3.2.3. Kolokalisation von GlyR $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten

Im nächsten Analyseschritt wurde untersucht, inwiefern die verschiedenen Glycinrezeptor  $\alpha$ -Untereinheiten an der Synapse mit GlyR $\beta$  kolokalisieren. Durch Doppelfärbungen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten wurde zum einen überprüft, ob alle GlyR $\alpha$ -Untereinheiten mit GlyR $\beta$ -Signal überlagern, und zum anderen die Spezifität der mGlyR $\beta$ -Färbung bestätigt.

In **Abb. 14 A-D** sind Fluoreszenzaufnahmen der IPL nach Färbung mit diversen GlyR-Antikörpern gezeigt. Hier markierte Bereiche sind in **Abb. 14 A2-4, B2-4, C2-4 und D2-4** vergrößert dargestellt. GlyR $\alpha$ -Untereinheiten sind punktförmig in der IPL angereichert. Wie bereits früher beschrieben ist das Verteilungsmuster der verschiedenen GlyR-Untereinheiten ( $\alpha$ 1-3) in der Retina Isoform-spezifisch (Sassoé-Pognetto *et al.*, 1994; Haverkamp *et al.*, 2003, 2004; Heinze *et al.*, 2007). So wurden GlyR $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 3 vorwiegend in Stratum 1 und 2 der IPL nachgewiesen. Signale des GlyR $\alpha$ 2-spezifischen Antikörpers zeigten sich punktförmig über alle Strata hinweg verteilt, während die  $\alpha$ 4-Isoform zwischen Stratum 3 und 4 stark angereichert ist. Hier wurde für jede Färbung der Anteil an GlyR $\alpha$ -Punkten bestimmt, welcher mit GlyR $\beta$ -Signal überlagerte. Eine Übersicht der Ergebnisse dieser Quantifizierung ist in **Abb. 14 E** gezeigt. Für die Glycinrezeptor-Untereinheiten  $\alpha$ 1-3 wurde gefunden, dass sie nahezu vollständig mit GlyR $\beta$  kolokalisieren ( $\alpha$ 1/ $\beta$ =91,6  $\pm$  0,3%;  $\alpha$ 2/ $\beta$ =98,6  $\pm$  0,7%;  $\alpha$ 3/ $\beta$ =98,0  $\pm$  0,4%).

Im Gegensatz hierzu fiel bei der Analyse der Kofärbung von GlyR $\beta$  und GlyR $\alpha$ 4 auf, dass die GlyR $\alpha$ 4-immunreaktiven Punkte häufig nicht mit GlyR $\beta$  zusammenfallen. Es überlagerten lediglich 63,0  $\pm$  7,8% der GlyR $\alpha$ 4-Cluster mit GlyR $\beta$ . Bei weiterer Analyse der Präparate wurde festgestellt, dass dieser Befund besonders für ein stark gefärbtes Band aus GlyR $\alpha$ 4-Punkten zwischen Stratum 3 und 4 gilt. Der Anteil von GlyR $\alpha$ 4, welcher mit GlyR $\beta$  kolokalisierte, war in diesem Bereich auf 46,0  $\pm$  8,3% reduziert, während er für die IPL ausserhalb diese Region bei 82,0  $\pm$  6,0% lag. Um die Kolokalisation der anderen GlyR $\alpha$ -Untereinheiten mit GlyR $\beta$  in diesem Bereich der Retina zu überprüfen, wurden für alle Färbungen die Kolokalisationen speziell in Stratum 3 und 4 erneut ausgezählt und statistisch ausgewertet. Das Ergebnis dieser Quantifizierung ist ebenfalls in **Abb. 14 E** dargestellt (hell-graue Säulen), jedoch war für die Färbungen von GlyR $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3 die Überlagerungsrate auch in diesem Bereich unverändert hoch (90,6  $\pm$  3,6%; 98,2  $\pm$  1,6% und 97,2  $\pm$  4,8%). Um die Beträge der Kolokalisationen generell besser bewerten zu können wurde eine weitere Kontrollzählung mit invertierten Überlagerungsbildern vorgenommen. Die so erzielten Zufallswerte lagen für alle Untereinheiten zwischen 7% und 17% und sind in **Abb. 14 E** für jedes Experiment angegeben (gestreifte Säulen). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass im Gegensatz zu den GlyR $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- und  $\alpha$ 3-Clustern, die stets mit GlyR $\beta$  kolokalisieren, GlyR $\alpha$ 4 in den Strata 3 und 4 nur eine beschränkte (<50%) Kolokalisation mit der  $\beta$ -Untereinheit zeigt.

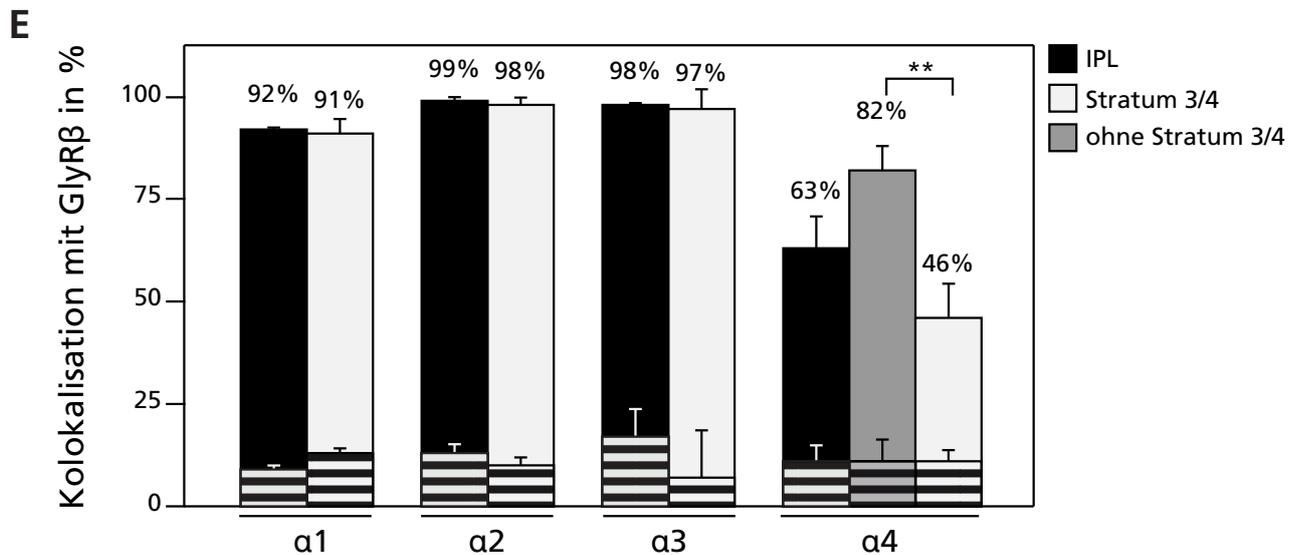
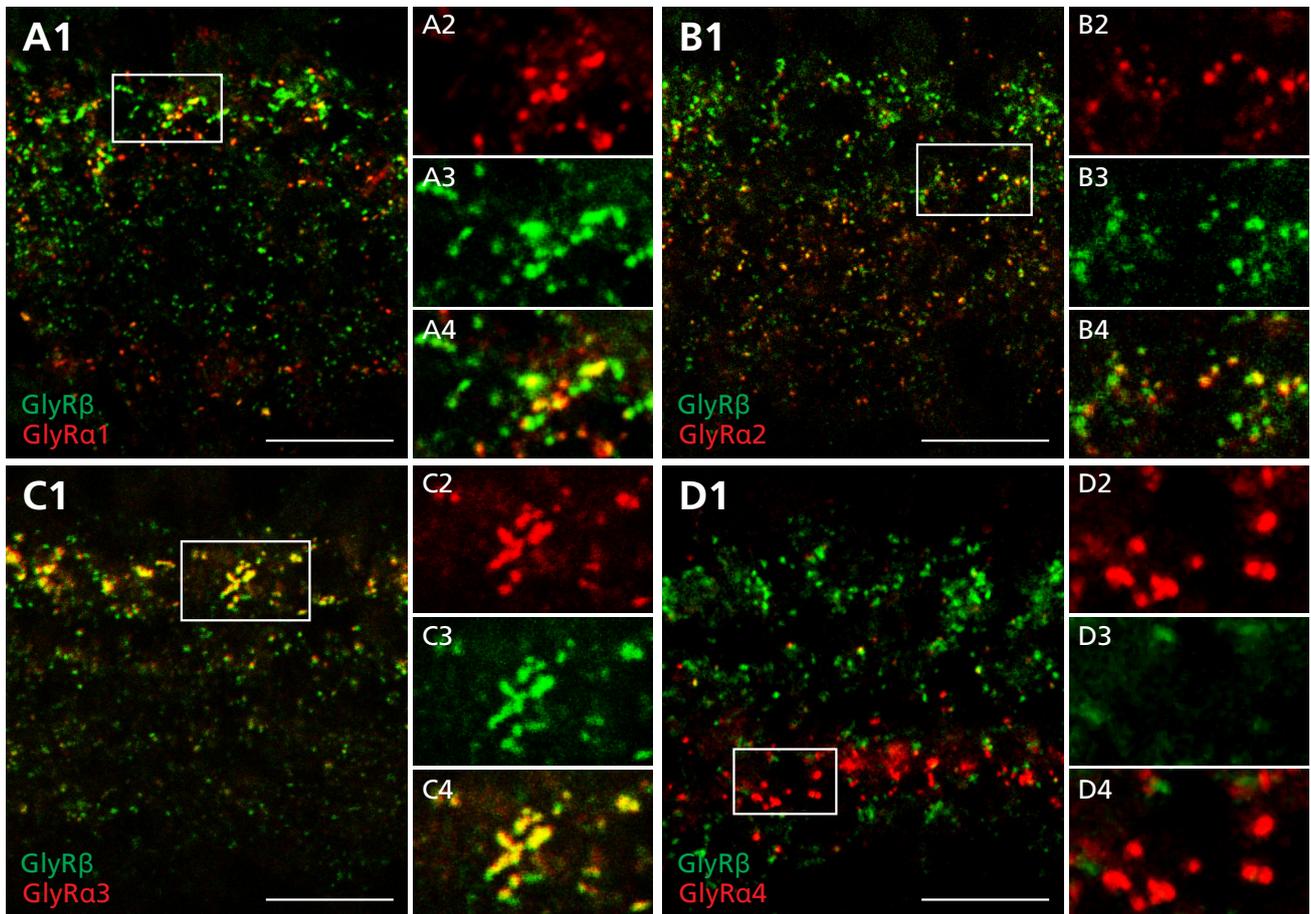


Abb. 14: Kokalisation von Glycinrezeptor-Untereinheiten in der IPL der Mausretina. Kryoschnitte wurden mit mGlyRβ und je einem polyklonalen Antikörper gegen GlyRα1-4 doppelgefärbt (A-D). Markierte Bereiche in A1, B1, C1 und D1 sind in Einzelkanal und Overlay-Darstellung vergrößert gezeigt (A2-4; B2-4; C2-4; D2-4). Maßstabsbalken: 15 μm. Die Anteile der GlyRα-Punkte, die mit GlyRβ-Signal überlagern, wurden für die gesamte und für Teilbereiche der IPL ausgezählt und sind in % angegeben (E). Gestreifte Säulen geben die gefundene zufällige Überlagerungsrate an. Verglichen mit GlyRα1-3 überlagern GlyRα4-Punkte in Stratum 3/4 der IPL weit weniger mit GlyRβ. \*\*:p<0,01

### 3.2.4. Kolokalisation von Gephyrin und GlyR $\alpha$ 1-4 in der Retina

Aus der reduzierten Koloaliation von GlyR $\beta$  und GlyR $\alpha$ 4 (siehe 3.2.3.) ergab sich die Frage, ob GlyR $\alpha$ 4 immer synaptisch lokalisiert ist. Deshalb wurde untersucht, ob sich die Kolokalisation mit Gephyrin in der Retina zwischen den verschiedenen GlyR $\alpha$ -Isoformen unterscheidet. Dazu wurde durch weitere immunhistochemische Doppelfärbungen die Verteilung von Gephyrin in der IPL und seine Kolokalisation mit den einzelnen GlyR $\alpha$ -Isoformen bestimmt (Abb. 15 A-D). In Abb. 15 A1, B1, C1 und D1 ist jeweils die gesamte IPL gezeigt. Hier markierte Bereiche sind in Abb. 15 A2-4, B2-4, C2-4 und D2-4 vergrößert dargestellt. Wie durch die Bilder und die Quantifizierung (Abb. 15 E) deutlich wird, sind durchschnittlich  $80 \pm 11\%$  aller gefärbten GlyR $\alpha$ -Punkte mit Gephyrin-positiven Punkten überlagert. Es gibt jedoch Unterschiede in den Kolokalisationsraten der jeweiligen GlyR $\alpha$ -Isoformen mit Gephyrin. Zudem wurden auch unterschiedliche Kolokalisationsraten innerhalb der IPL beobachtet. So war in den distalen Strata 1 und 2 ein geringerer Anteil von GlyR $\alpha$ 1-Punkten mit Gephyrin kolokalisiert. Kolokalisationswerte, die für die gesamte IPL errechnet wurde, lagen mit  $81,2 \pm 18,9\%$  etwas niedriger als die gesondert quantifizierten Werte für die weiter proximal gelegenen Strata 3 und 4 ( $89,3 \pm 9,6\%$ ).

Die GlyR-Isoformen  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3 wiesen eine ähnlich hohe Kolokalisation mit dem Gephyrin-Signal auf ( $\alpha$ 2:  $91,6 \pm 7,2\%$ ;  $\alpha$ 3:  $81,9 \pm 3,9\%$ ). Für GlyR $\alpha$ 4 war der Anteil von Gephyrin-Überlagerungen über die gesamte IPL deutlich geringer ( $64,4 \pm 6,0\%$ ). Bei der Betrachtung der Fluoreszenzaufnahme der IPL in Abb. 15 D1 fällt auf, dass besonders die Bereiche hoher  $\alpha$ 4-Punktdichte in Stratum 3 und 4 nur zu einem geringen Teil mit Gephyrin kolokalisieren. Eine gezielte Quantifizierung dieses Bereichs der IPL bestätigte diesen Eindruck und ergab hier eine geringe Kolokalisation von nur  $49,4 \pm 7,7\%$ . In den übrigen Bereichen der IPL war die Überlagerungsrate demgegenüber stark erhöht und mit  $85,9 \pm 6,0\%$  auf einem Niveau vergleichbar mit GlyR $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3. Die Aussagekraft dieser Werte wurde durch die Bestimmung von zufälligen Kolokalisationen jedes Bildes (siehe auch 3.2.3.) in den beschriebenen Regionen bestätigt. Die bestimmten Zufallswerte lagen für alle Experimente zwischen 12 und 19% (Abb. 15 E, gestreifte Säulen). Diese Beträge sind geringer als die gemessenen Unterschiede in den Kolokalisationsraten. Wir schliessen aus diesen Ergebnissen, dass GlyR $\alpha$ 4 in der Tat in Strata 3 und 4 der IPL zu etwa 50% nicht über Gephyrin geclustert ist.

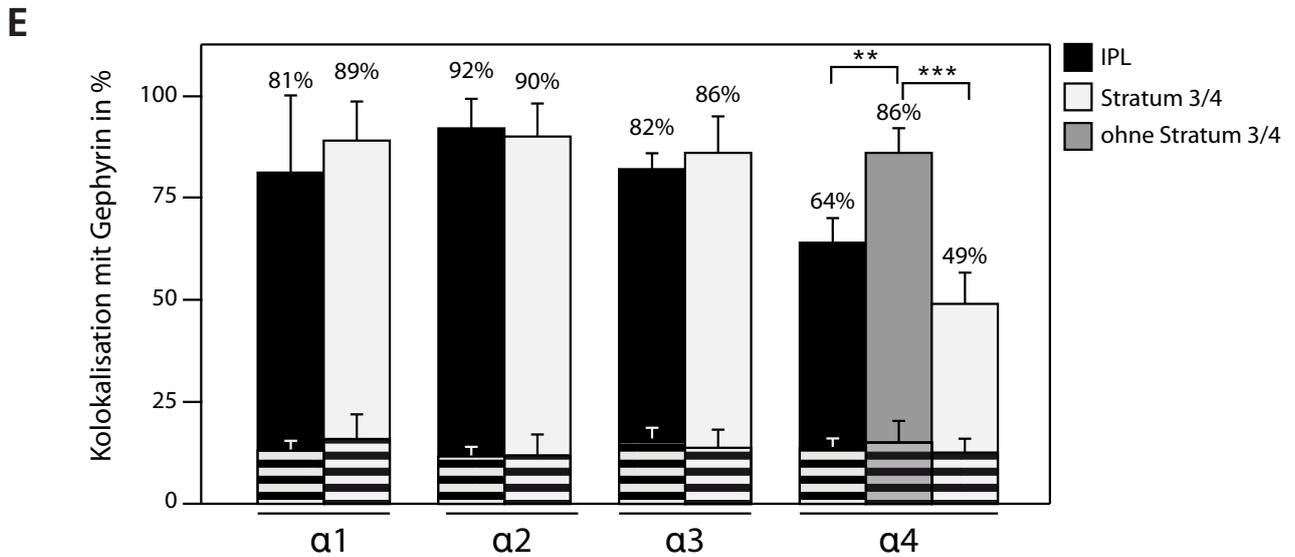
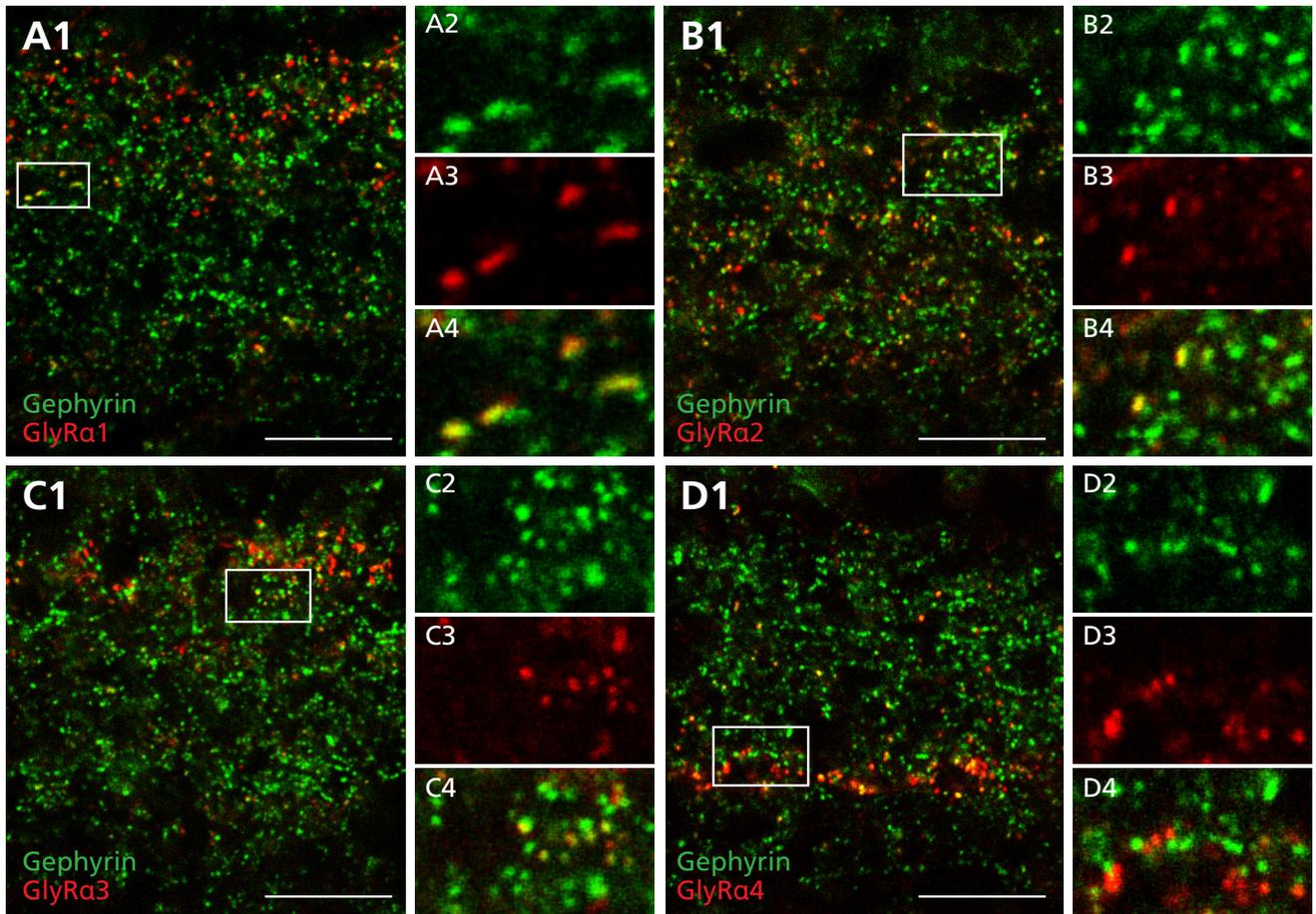


Abb. 15: Doppelfärbung von Gephyrin und GlyRa1-4 in der IPL der Mausretina. Kryoschnitte wurden mit Ab7a gegen Gephyrin und je einem polyklonalen Antikörper gegen eine der GlyRa-Untereinheiten gefärbt (A-D). Markierte Bereiche in A1, B1, C1 und D1 sind vergrößert dargestellt (A2-4; B2-4; C2-4; D2-4). Die Anteile der GlyRa-Punkte, die mit Gephyrin-Immunität überlagern, wurden für die gesamte IPL und für Teilbereiche der IPL bestimmt (E). Gestreifte Säulen geben den Betrag der gefundenen zufälligen Überlagerungsrate an. Verglichen mit GlyRa1-3 überlagern GlyRa4-Punkte in Stratum 3/4 der IPL signifikant weniger mit Gephyrin. Maßstabsbalken: 15  $\mu$ m. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

### 3.2.5. Spezifität der GlyR $\alpha$ 4-Färbung in Stratum 3/4 der IPL von Maus-Retina

Aus der Beobachtung, dass GlyR $\alpha$ 4 in der Retina nur teilweise mit Gephyrin und GlyR $\beta$  kolokalisierte, resultierte zum einen die Frage, ob der verwendete GlyR $\alpha$ 4-Antikörpers hier spezifische Signale liefert. Zum anderen war unklar, ob die punktförmig geclusterten GlyR $\alpha$ 4-Signale synaptisch lokalisiert sind. Deshalb wurde in einem weiteren immunhistochemischen Experiment überprüft, ob das mit dem polyklonalen GlyR $\alpha$ 4-Antikörper in Stratum 3/4 gefärbte Protein auch durch mAb4a erkannt wird.

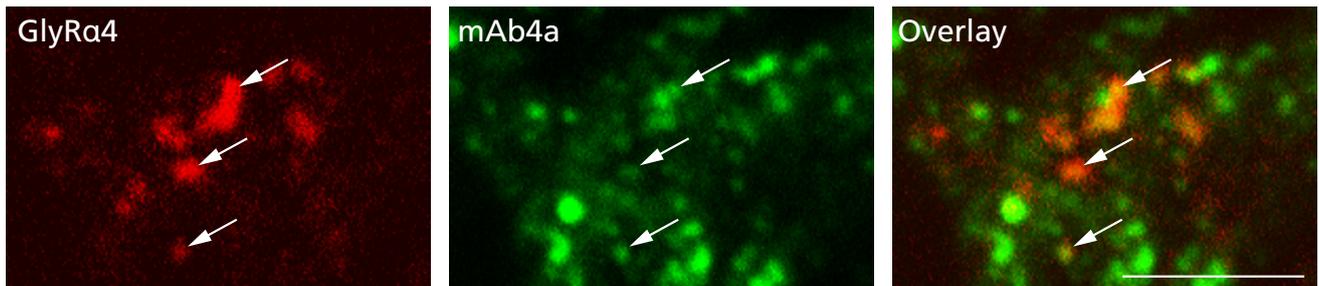


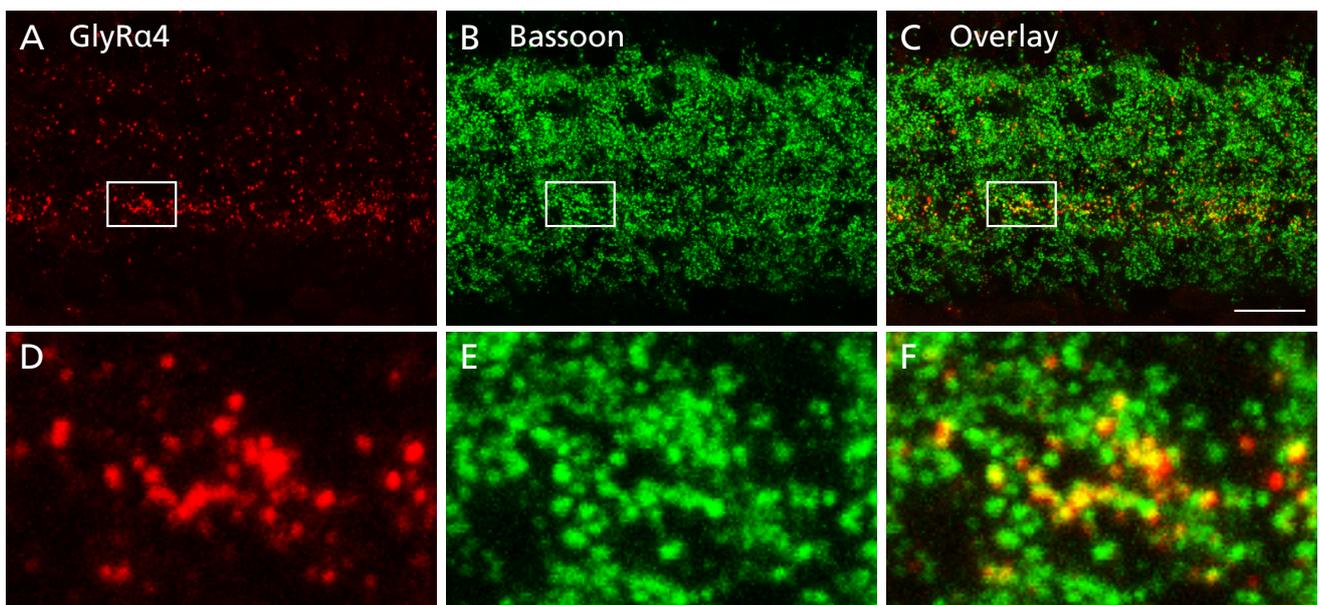
Abb. 16: GlyR $\alpha$ 4 kolokalisiert in Stratum 3/4 der IPL mit mAb4a. Kryoschnitte wurden mit mAb4a (grüner Kanal) und einem polyklonalen Antikörper gegen GlyR $\alpha$ 4 (roter Kanal) doppelgefärbt (A-C). Einige überlagernde Antikörpersignale sind durch Pfeile gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m.

Die Doppelfärbungen der Retina mit GlyR $\alpha$ 4 und mAb4a wurde durch konfokale Mikroskopie aufgenommen und Kolokalisationsraten innerhalb der IPL in einzelnen optischen Schnitten ausgewertet. Das Ergebnis bestätigt die Spezifität des polyklonalen Antikörpers gegen die GlyR $\alpha$ 4-Untereinheit, da der Glycinrezeptor-bindende mAb4a zu hohem Anteil mit diesem überlagert ( $74 \pm 9\%$ ). Es wurden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Strata beobachtet. Wie in Abb. 16 zu erkennen ist, sind viele der  $\alpha$ 4-immunreaktiven Punkte nur schwach mit dem als Referenz für Glycinrezeptoren verwendeten Antikörper mAb4a gefärbt (Pfeile). Daher wird dieses Ergebnis als Hinweis gewertet, dass es sich bei den Färbungen von GlyR $\alpha$ 4 in Stratum 3 und 4 der IPL um eben diese Glycinrezeptor-Untereinheit, und nicht um eine unspezifische Bindung des Antikörpers handelt.

### 3.2.6. Subzelluläre Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4 in Stratum 3/4 der IPL

Um weitere Hinweise zu erhalten, ob es sich hier um synaptisches Protein oder extrasynaptische Moleküle handelt, wurde eine Bestimmung der genauen subzellulären Lokalisation des GlyR $\alpha$ 4-Signals durchgeführt. Hierzu wurde GlyR $\alpha$ 4 mit dem präsynaptischen Marker-Protein Bassoon

doppelfärbt. In Doppelfärbungen dieses Cytomatrixproteins mit GlyR $\alpha$ 4 wurde überprüft, ob diese GlyR-Isoform an Synapsen angereichert sind. In **Abb. 17 A** ist eine derartige Färbung der IPL gezeigt. Bei den Bildern handelt es sich um mehrere optische Schnitte, welche in z-Ebene hintereinander aufgenommen wurden. Bassoon-Immunreaktivität war punktförmig über die gesamte IPL verteilt. In der Vergrößerung wird deutlich, dass ein hoher Anteil von GlyR $\alpha$ 4-Signal vollkommen oder teilweise mit Bassoon überlagert. Die Quantifizierung der Kollokationen (**Abb. 17 B**) zeigte, dass  $89 \pm 3\%$  aller GlyR $\alpha$ 4-positiven Synapsen mit Bassoon zusammenfallen. Speziell in Stratum 3 und 4 wurde ein kaum hiervon abweichender Überlagerungswert von  $90 \pm 3\%$  gemessen. Somit kann die Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4-Protein als synaptisch bewertet werden. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Appositionsrate von Bassoon und GlyR $\alpha$ 4 in den Strata 3 und 4, welche reduzierte GlyR $\beta$ - und Gephyrin-Immunreaktivität zeigten, und der Appositionsrate von Bassoon und GlyR $\alpha$ 4 außerhalb dieser Strata.



**Abb. 17: Doppelfärbung von Bassoon und GlyR $\alpha$ 4 in der Mausretina.** Kryoschnitte wurden mit Antikörpern gegen GlyR $\alpha$ 4 und Bassoon gefärbt. Übersichtsaufnahmen der IPL dieser Schnitte sind in **A**, **B** und **C** gezeigt. markierte Bereiche innerhalb der IPL sind in **D**, **E** und **F** vergrößert dargestellt. Maßstabsbalken: 15  $\mu$ m.

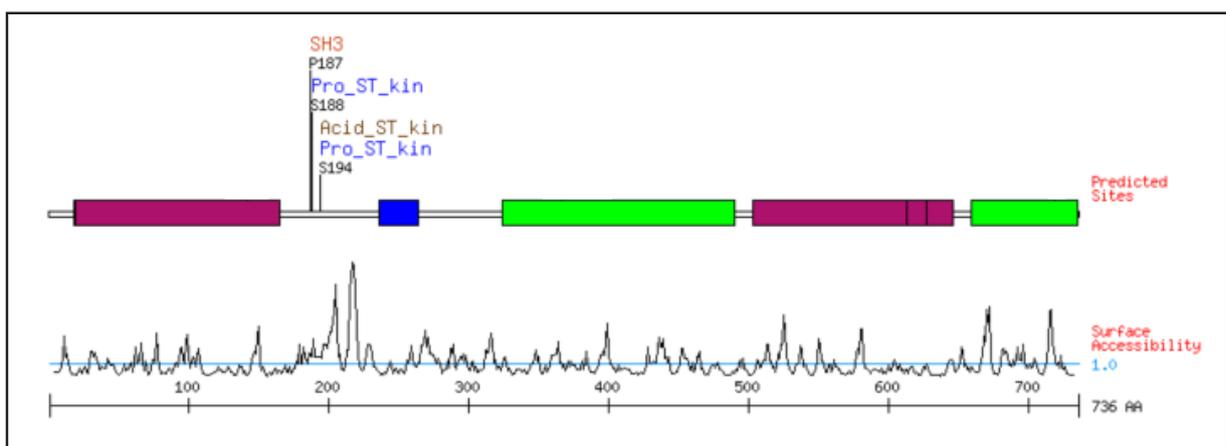
Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass GlyR $\alpha$ 4-Untereinheiten in einem prominenten Band zwischen Stratum 3 und 4 der IPL zu 54% nicht mit GlyR $\beta$  komplexiert vorliegen. Des weiteren weisen Doppelfärbungen mit dem Gephyrin-spezifischen Antikörper mAb7a ein ähnliches Überlagerungsmuster bezüglich GlyR $\alpha$ 4 auf. Das bedeutet, dass 51% der punktförmigen GlyR $\alpha$ 4-Signale von Stratum 3 und 4 nicht mit mAb7a-Fluoreszenz überlagerte.

### 3.3. Untersuchungen zur Regulation postsynaptischer Gephyrincluster durch Phosphorylierung

Neue pharmakologische Untersuchungen ergaben, dass es zu einem Verlust von synaptischen Gephyrinclustern in kultivierten Neuronen kommt, wenn die Proteinphosphatasen 1 (PP1) oder 2a (PP2a) inhibiert werden (Bausen *et al.*, 2010). Sowohl bei PP1 als auch bei PP2a handelt es sich um Serin-/Threonin-Phosphatasen, was im Einklang mit früheren Befunden steht, dass Gephyrin an diesen Aminosäureresten phosphoryliert werden kann (Langosch *et al.*, 1992). Dies lässt vermuten, dass die genannten Phosphatasen vorhandene Phosphoserin- und der Phosphothreoninreste von Gephyrin hydrolysieren und dies einen Einfluss auf die Assemblierung von Gephyrin zu höhermolekularen Komplexen hat. Die Proteinphosphatasen 1 und -2a könnten demnach direkt an der Regulation postsynaptischer Gephyrincluster und somit der Effizienz inhibitorischer Synapsen im Zentralnervensystem beteiligt sein.

#### 3.3.1. Ermittlung potentieller Phosphorylierungsstellen von Gephyrin

Zunächst wurden potentielle Phosphorylierungsstellen von Gephyrin durch Sequenzanalyse identifiziert. Hierzu wurde das Programm SCANSITE benutzt, eine spezielle Software des Massachusetts Institute of Technology ([www.scansite.mit.edu](http://www.scansite.mit.edu)), welche eingegebene Proteinsequenzen mit Datenbanken bekannter Sequenzen um Phosphorylierungsstellen abgleicht und als Ergebnis Konsensussequenzen ausgibt (Obenauer *et al.*, 2003). Das Ergebnis der Scansite-Suche ist in **Abb. 18** dargestellt. Zwei Serine an den Positionen 188 bzw. 194 der Gephyrin-Proteinsequenz wurden als wahrscheinliche Phosphorylierungsstellen gefunden.



**Abb. 18:** Ermittlung potentieller Phosphorylierungsstellen über SCANSITE ([www.scansite.mit.edu](http://www.scansite.mit.edu)). Die Aminosäuren S188 und S194 werden als wahrscheinliche Ziele von Serin-/Threonin-Kinasen angegeben. Die Oberflächen-Zugänglichkeit des Proteins für Bindeproteine wie Kinasen wurde für diese Stellen als hoch errechnet (unterer Bildteil).

Für beide Aminosäurepositionen ist durch massenspektrometrische Analysen gezeigt worden, dass sie sowohl in Maus als auch im Menschen *in vivo* phosphoryliert werden (Gnad *et al.*, 2007).

### **3.3.2. Expression von GFP-Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten in HEK293T-Zellen**

Um festzustellen, ob die Phosphorylierung von Serin 188 und 194 wichtig für die Gephyrin-Aggregation oder -Bindung an Cytoskelett-assoziierte Interaktionspartner ist, wurden Punktmutationen in die Gephyrin-cDNA eingebracht, welche die Phosphorylierung dieser Reste verhindern. Dies wurde durch den Austausch der Serin-Kodons durch Alanin-Triplets erzielt. Als Positivkontrolle werden Mutanten hergestellt, bei denen die gleichen Positionen für Glutamat kodieren. Glutamat trägt eine starke negative Ladung, welche die Ladungseigenschaften phosphorylierter Aminosäuren imitiert.

Die Punktmutationen wurden in ein vorhandenes pEGFP-Gephyrin-Plasmid eingeführt (siehe 2.2.9.2.). In einem negativen Konstrukt, welches nicht phosphoryliert werden kann, wurden die Serine 188 und 194 durch Alanine ausgetauscht (GFP-Gephyrin<sub>AA</sub>). In einem weiteren Konstrukt wurden die gleichen Serine zu Glutamat mutiert, um die negative Ladung von Phosphorylierungen dauerhaft zu imitieren (GFP-Gephyrin<sub>EE</sub>). Anschließend wurde getestet, wie sich diese Gephyrin-Mutanten im Cytoplasma verteilen, wenn sie in Säugerzellen exprimiert werden. Da Gephyrin mit mehreren Proteinen interagiert, die es mit dem Zytoskelett der Zelle verbinden, wie das Aktin-bindende Vasolidator-Stimulated Phosphoprotein (VASP) oder das Microtubuli-bindende Motorprotein Dynein Light Chain-1 (DLC-1), wurde untersucht, ob die eingebrachten Mutationen die Interaktion mit diesen Proteinen beeinflussen. Über ein „Blob-Assay“ (siehe 1.5.3.) wurde überprüft, ob die Gephyrin-Mutanten ein verändertes Aggregationsverhalten aufweisen, und ob DLC-1 und VASP mit den Selben interagieren und sich in Blobs anreichern.

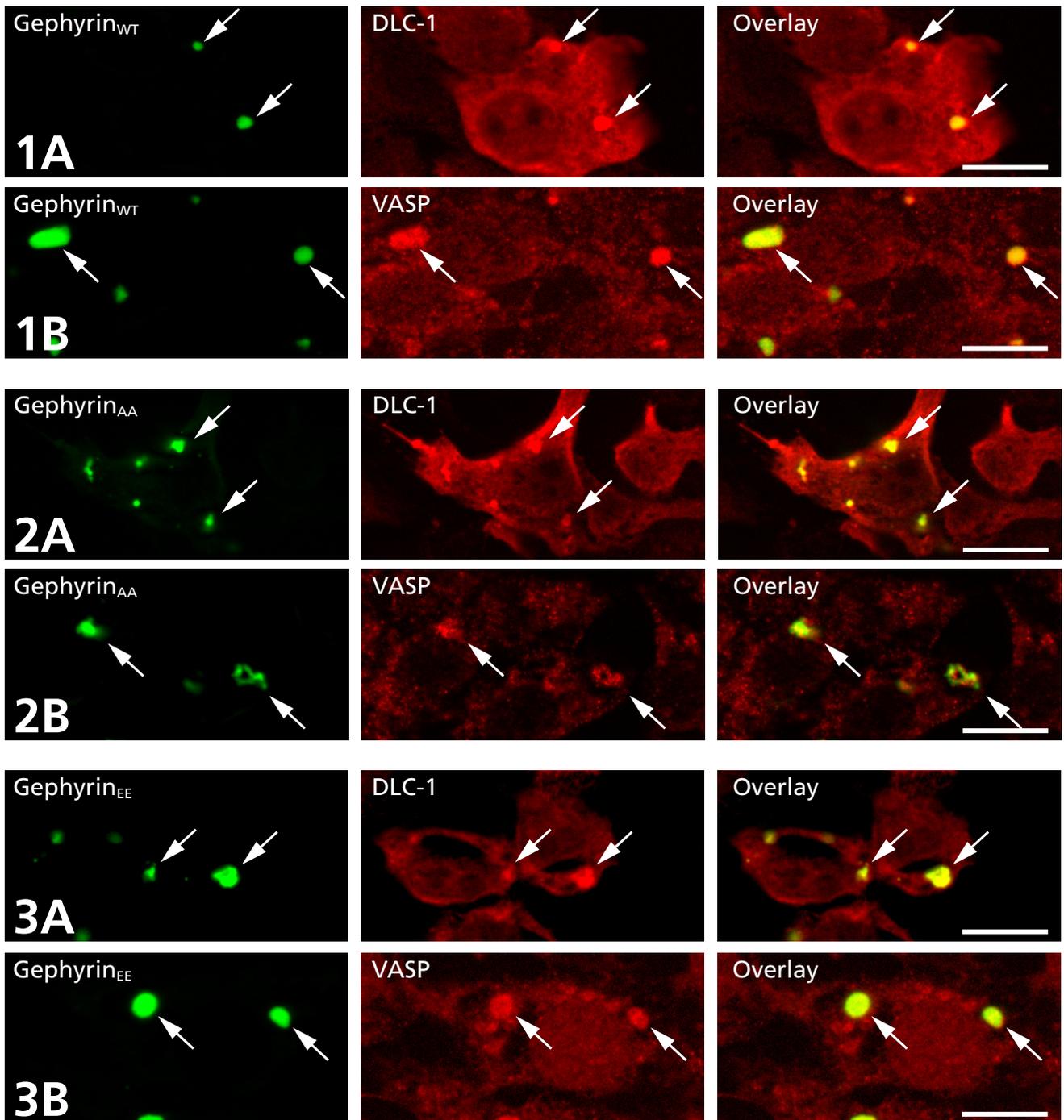


Abb. 19: Blob-Assay in HEK293T-Zellen. GFP-Gephyrin<sub>WT</sub> (1 A,B), GFP-Gephyrin<sub>AA</sub> (2 A,B) und GFP-Gephyrin<sub>EE</sub> (3 A,B) wurden in HEK293T-Zellen für 7 h exprimiert und diese anschließend fixiert. Die Expression aller GFP-Gephyrin-Konstrukte führte zur Entstehung von Blobs (grüner Kanal, weiße Pfeile). (1 A, 2 A, 3 A) myc-DLC-1-cDNA wurde koexprimiert und das myc-Epitop mit Antikörpern gefärbt (roter Kanal). myc-DLC-1 ist deutlich mit den Gephyrin-Blobs kolokalisiert (Overlay). (1 B, 2 B, 3 B) Antikörper-Färbungen von endogenem VASP zeigen eine Anreicherung des Proteins in Gephyrin Blobs von WT und mutierten Konstrukten (roter Kanal und Overlay); Messbalken: 10  $\mu$ m.

In den in Abb. 19 gezeigten Versuchen konnten keine Veränderungen der Oligomerisations-Eigenschaften von Gephyrin durch die Einführung der oben genannten Punktmutationen

gefunden werden. Die starke Expression der Gephyrin-Konstrukte unter Kontrolle eines CMV-Promotors führte zur Entstehung von Blobs, unabhängig von Anwesenheit und Art der eingeführten Substitutionen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die modifizierten Gephyrin-Konstrukte, genauso wie das Wildtyp-Protein, DLC-1 und VASP in cytoplasmatische Blobs rekrutieren (siehe **Abb. 19** und Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend konnte kein Einfluss der eingebrachten Mutationen auf die Aggregation von Gephyrin in HEK293T-Zellen und dessen Interaktion mit DLC-1 oder VASP nachgewiesen werden.

### **3.3.3. Synaptische Lokalisation von GFP-Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten in hippocampalen Neuronen**

Pharmakologische Studien zur Inhibition von Phosphatasen hatten einen Verlust von Gephyrin an inhibitorischen Synapsen und eine Anreicherung des Proteins im Cytoplasma von Neuronen ergeben (Bausen *et al.*, 2010). Die unter 3.3.2. beschriebenen Versuche zur Expression von Gephyrin-Konstrukten in HEK293T-Zellen ergaben keine Hinweise auf einen Einfluss von Phosphorylierungen an den Aminosäuren S188 und S194 auf die subzelluläre Lokalisation von Gephyrin. Diese Untersuchungen in HEK293T-Zellen erlauben jedoch keine Aussagen über das Verhalten der Mutanten-Proteine im nativen Gewebe. Um der *in vivo* Situation näher zu kommen, wurden deshalb hippocampale Neuronenkulturen, welche auch endogen Gephyrin exprimieren, mit GFP-Gephyrin<sub>WT</sub> und den Mutanten GFP-Gephyrin<sub>AA</sub> und GFP-Gephyrin<sub>EE</sub> transfiziert (siehe 2.3.7.). Die exprimierten Proteine wurden durch die Fluoreszenz des GFP-Fusionsanteils unter dem Mikroskop sichtbar. Der vesikuläre inhibitorische Aminosäuretransporter (VIAAT) diente als Markerprotein der inhibitorischen Präsynapse und Referenz für synaptische Lokalisation.

Die Expression der Gephyrin-Konstrukte in hippocampalen Neuronenkulturen führte sowohl zur Entstehung von cytoplasmatischen Blobs, als auch zur Anreicherung von GFP-Gephyrin an inhibitorischen Nervenendigungen (**Abb. 20 A-C**). Über die Transfektion von GFP-Gephyrin<sub>EE</sub> wurde wie bei 3.2.2. versucht, ein voll phosphoryliertes Gephyrin-Protein nachzuahmen. Wie oben erläutert, kommt es bei Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren rasch zu einem Verlust von synaptischen Gephyrinclustern (Bausen *et al.*, 2010). Ein ähnlicher Effekt war bei der Expression von GFP-Gephyrin<sub>EE</sub> in den transfizierten Neuronenkulturen nicht erkennbar (**Abb. 20 C**). Ähnlich verhiert es sich bei der Expression von GFP-Gephyrin<sub>AA</sub>. Auch dieses Protein war deutlich gegenüber VIAAT-Clustern appositioniert und demnach an inhibitorischen Synapsen angereichert. Bezüglich der synaptischen Lokalisation konnten keine offenkundigen Unterschiede zwischen Gephyrin<sub>WT</sub> und den mutierten Gephyrin-Konstrukten gefunden werden.

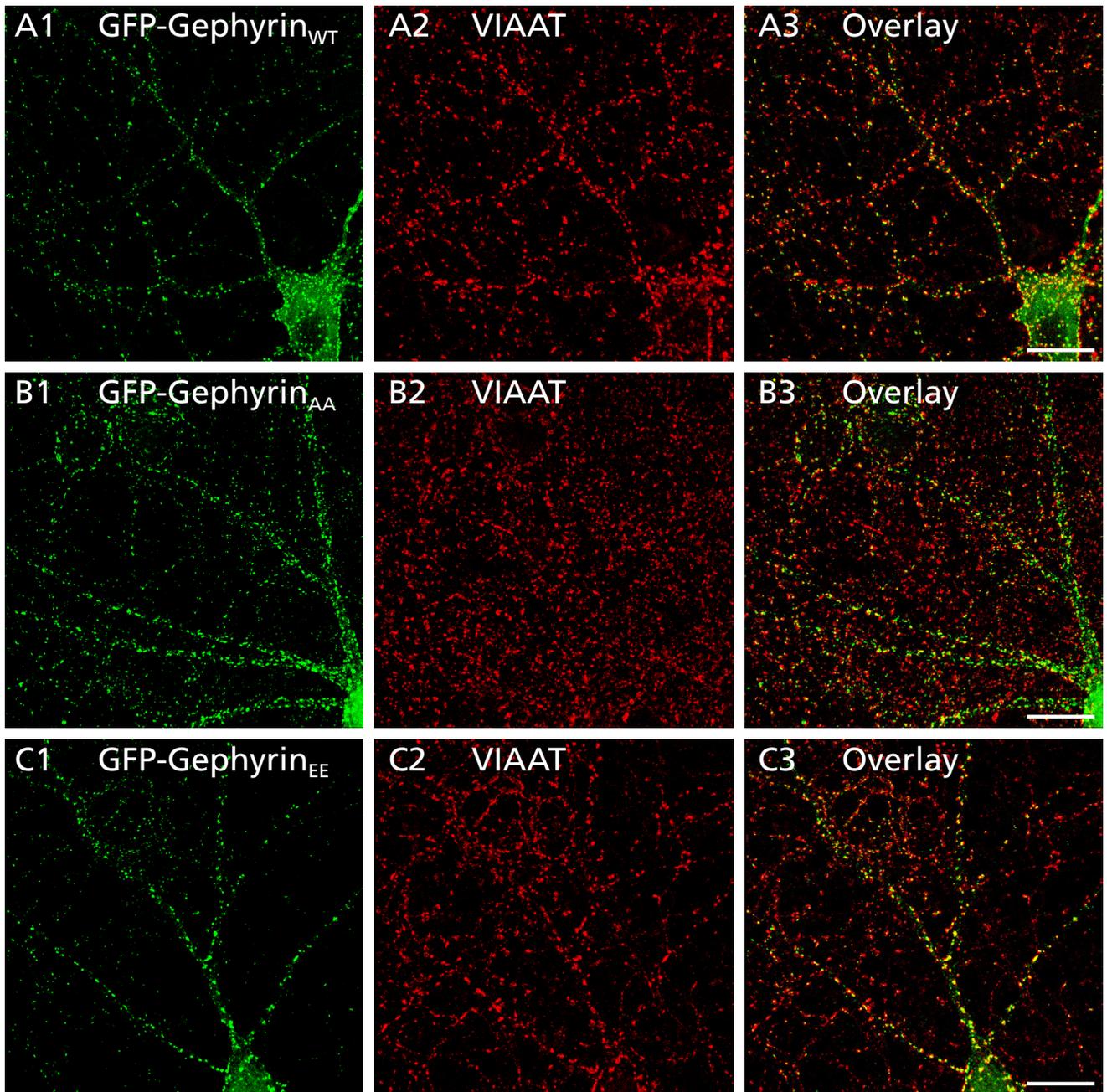


Abb. 20: Synaptische Lokalisation von GFP-Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten in hippocampalen Neuronenkulturen. cDNAs kodierend für (A) GFP-Gephyrin<sub>WT</sub>, (B) GFP-Gephyrin<sub>AA</sub> und (C) GFP-Gephyrin<sub>EE</sub> wurden in hippocampale Neuronen transfiziert (A1+3, B1+3, C1+3). Das GFP-Signal der Fusionsproteine ist punktförmig an Synapsen angereichert. Das präsynaptische Markerprotein VIAAT wurde mit polyklonalen Antikörpern gefärbt (A2, B2, C2). Synaptisch lokalisierte Gephyrincluster (grüner Kanal) sind durch Überlagerung mit VIAAT (roter Kanal) als gelbe Punkte entlang von Dendriten sichtbar (A3, B3, C3). Messbalken: 20 µm.

### 3.3.4. Kollokalisierung von Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten mit GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch die Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten, ähnlich wie Gephyrin<sub>WT</sub>, synaptisch lokalisiert sind (siehe 3.3.3.). Dieses Verhalten wurde in weiteren immunocytochemischen Untersuchungen bestätigt. Dafür wurde zunächst die Anzahl GFP-Gephyrin-positiver Synapsen in Bezug auf Kollokalisierung mit VIAAT und der  $\gamma$ 2-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2) quantifiziert. So liessen sich Aussagen darüber treffen, wieviele inhibitorische Synapsen GFP-Gephyrincluster aufweisen, und die Zahlen mit Werten von endogenem Gephyrin und der Literatur vergleichen. Weiterhin wurde mit den Antikörperfärbungen von GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2 auch die Fähigkeit von Gephyrin untersucht, Neurotransmitterrezeptoren an der Synapse anzureichern und zu stabilisieren. Dies erfolgte zum einen über quantitative Analysen, d.h. durch Bestimmung die Anzahl GFP-Gephyrin-positiver Synapsen, die mit GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2 kollokalisiert sind, und zum anderen über qualitative Untersuchungen der Proteinclusterdichte über die Messung von Fluoreszenzintensitäten.

Kofärbungen von VIAAT in transfizierten Neuronen (siehe **Abb. 21**) zeigten, dass unabhängig von WT, AA und EE 94-96% der VIAAT positiven Synapsen mit GFP-Gephyrin geclustert vorlagen ( $p > 0,1$ ). Die durchschnittliche Dichte von GFP-Gephyrin und VIAAT Punkten (Cluster/ $\mu$ m) war praktisch identisch für die WT-, AA- und EE-Proteine ( $p > 0,1$ ). Um zu überprüfen ob der Verlust potentieller Phosphorylierungsstellen das Clustering der endogenen GABA<sub>A</sub>R  $\gamma$ 2-Untereinheiten beeinflusst, wurde dieses Rezeptorprotein mittels spezifischer Antikörper gefärbt. Wie bei GFP-Gephyrin/VIAAT zeigten 93-98% der Gephyrincluster eine Kollokalisierung mit  $\gamma$ 2-positiven GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, unabhängig ob WT-, AA- und EE-cDNAs transfiziert worden waren (siehe **Tabelle 1**).

Außerdem wurden die Phosphorylierungsmutanten dahingehend untersucht, ob sie, verglichen mit dem GFP-Gephyrin<sub>WT</sub>, endogene GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-Cluster in ihrer durchschnittlichen Größe oder Fluoreszenzintensität verändern. Zur Erzeugung von Referenzwerten wurden zunächst die Größe und Intensität von GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-Clustern nur an GFP-Gephyrin-positiven Synapsen bestimmt und mit der Größe und Intensität von GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-Clustern aller Synapsen eines Dendriten verglichen.

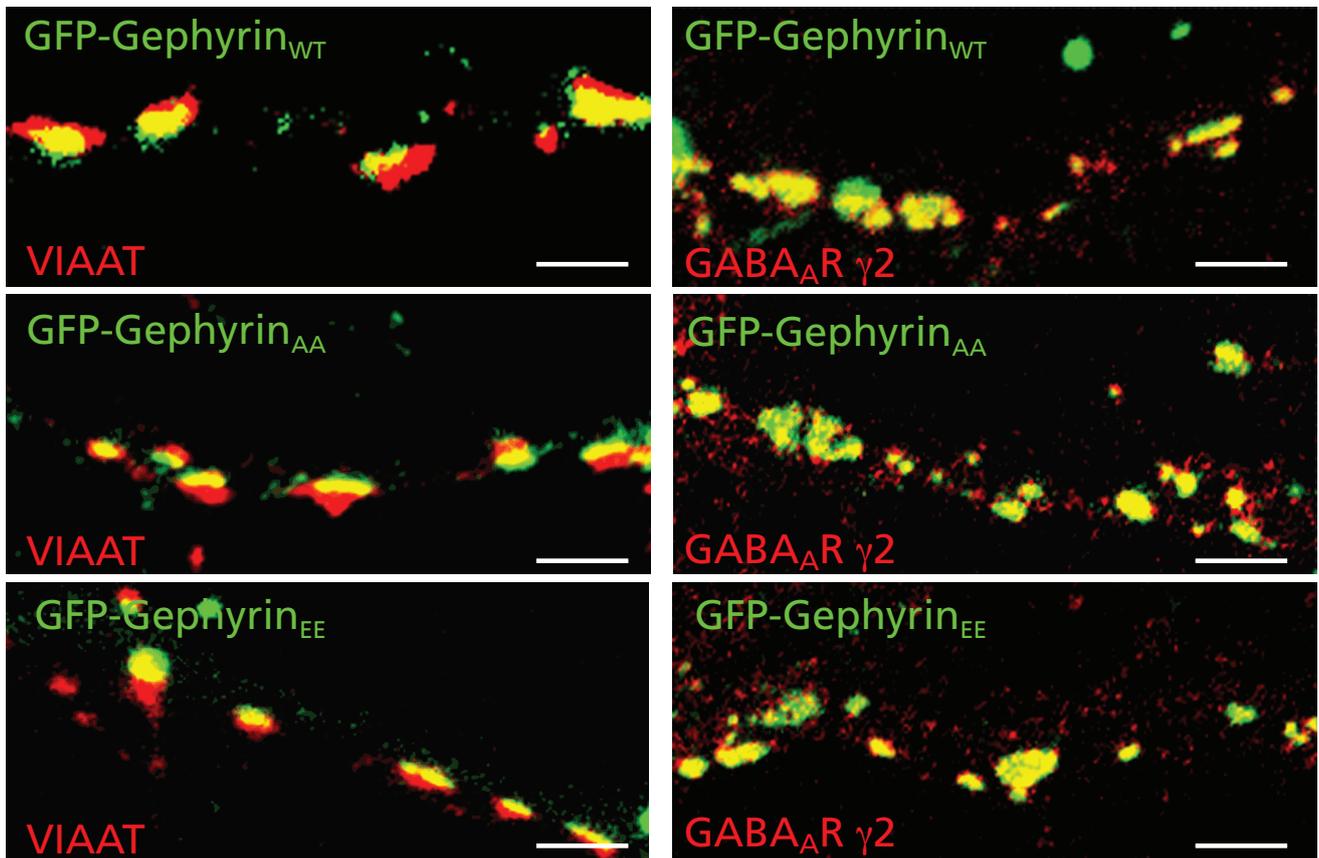


Abb. 21: Analyse der Kolokalisation von GFP-Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten mit VIAAT und GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2 in hippocampalen Neuronen. Neuronen (DIV 14) wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert, nach 6 Tagen fixiert und mit Antikörpern gegen VIAAT bzw. GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2 gefärbt (roter Kanal). Messbalken = 4  $\mu$ m.

Tabelle 1: Zusammenfassung der gemessenen Kolokalisationen, Cluster-Dichten, -Größen und -Fluoreszenz-Intensitäten in transfizierten Neuronen.

	Kolokalisation [%]		Cluster/ $\mu$ m		$\gamma$ 2-Fluoreszenzintensität [A.U.]		$\gamma$ 2-Clustergröße [ $\mu$ m <sup>2</sup> ]	
	VIAAT	$\gamma$ 2	GFP-Gephyrin	VIAAT	GFP-positive Synapsen	Alle Synapsen	GFP-positive Synapsen	Alle Synapsen
WT	96,0 $\pm$ 3,7	94,5 $\pm$ 4,1	0,46 $\pm$ 0,16	0,46 $\pm$ 0,19	147,3 $\pm$ 7,9 ***	112,8 $\pm$ 3,7	0,31 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,01
AA	94,0 $\pm$ 5,8	98,4 $\pm$ 2,8	0,56 $\pm$ 0,12	0,56 $\pm$ 0,13	140,8 $\pm$ 7,3 ***	106,9 $\pm$ 2,7	0,26 $\pm$ 0,01 ***	0,33 $\pm$ 0,02
EE	94,5 $\pm$ 5,3	93,9 $\pm$ 9,5	0,53 $\pm$ 0,14	0,52 $\pm$ 0,13	141,6 $\pm$ 7,6 ***	112,4 $\pm$ 3,7	0,32 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,01

Kolokalisationswerte von GFP-Gephyrin<sub>WT</sub>, GFP-Gephyrin<sub>AA</sub> und GFP-Gephyrin<sub>EE</sub> mit VIAAT bzw. GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2 in % und die Dichten von GFP- bzw. VIAAT-Clustern sind in Cluster/ $\mu$ m angegeben. Fluoreszenzintensitäten und Größen von GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-Clustern wurden für GFP-positive Synapsen und für alle Synapsen im untersuchten Dendritensegment bestimmt und sind in willkürlichen Einheiten (*engl.* arbitrary units, A.U.), bzw. in  $\mu$ m<sup>2</sup> angegeben. Signifikant verschiedene Werte sind zwischen den betreffenden Feldern gekennzeichnet (\*\*\*)  $p < 0,001$ ;  $n = 10$ ). Die gemessenen Werte zeigen keine starken Unterschiede in der Gephyrincluster-Anzahl, -Fluoreszenz-Intensität oder GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-Clustergröße in Abhängigkeit von der Art des transfizierten Gephyrin-Konstrukts.

Diese Messung ergab signifikant unterschiedliche Intensitäten von GABA<sub>A</sub>R-Clustern innerhalb der beiden Gruppen, wobei die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von GABA<sub>A</sub>Rγ2-Clustern an Synapsen mit GFP-Gephyrin höher war als die des Durchschnitts aller GABA<sub>A</sub>Rγ2 positiven Synapsen (140-148 A.U. und 106-113 A.U.,  $p < 0,0001$ ), unabhängig von WT, AA und EE. Bezüglich der mittleren Clustergröße konnten zwischen GFP-Gephyrin-positiven und allen GABA<sub>A</sub>Rγ2-geclusterten Synapsen eine leichte Reduktion für AA, aber nicht für EE und WT festgestellt werden (siehe **Tabelle 1**). Die hier erzielten Daten zeigen, dass die Phosphorylierung der Serinreste 188 und 194 des Gephyrin-Proteins keinen nachweisbaren Einfluss auf dessen synaptische Lokalisation und nur einen minimalen Effekt auf das Clustering von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren hat.

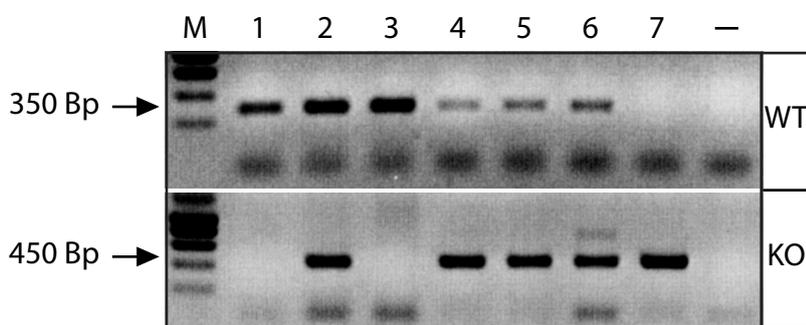
### **3.4. Vergleichende Analyse der Genexpression in Wildtyp- und Gephyrin-defizienten Mäusen**

Vorangegangene Studien zur Untersuchung von Gephyrin und dessen Funktion an der Synapse zielten auf die Enthüllung neuer Interaktionspartner ab (Kins *et al.*, 2000; Fuhrmann *et al.*, 2002). Indirekte funktionelle Zusammenhänge lassen sich durch die Analyse von Protein-Interaktionen jedoch oft nur schwer erkennen. Hier wurde der Frage nachgegangen, ob es durch den Verlust des Gephyrin-Gens zu Veränderungen in der mRNA-Expression von Nervenzellen kommt. Da es bislang keine Untersuchungen zu diesem Thema gab, wurde ein Ansatz gewählt, mit welchem sich ein möglichst breites Spektrum von messenger RNAs quantitativ analysieren lässt, die Expressionsmicroarray-Methode. Die hierfür benötigten Chips sind kommerziell erhältlich. Als Untersuchungsmaterial diente Gewebe aus dem Zentralnervensystem (ZNS) einer Gephyrin-defizienten Maus-Linie (Feng *et al.*, 1999) und aus Wildtyp-Mäusen (WT) des Inzeststammes C57/Black6. Im Rahmen dieser Analyse wurde die Untersuchung auf Vorderhirnpräparationen beschränkt. Diese wurden auf Unterschiede in der mRNA Expression verglichen.

#### **3.4.1. Genotypisierung von Mäusen**

Das Genom von Mäusen aus heterozygoten C57/Black6-Gephyrin-KO-Verpaarungen wurde direkt nach der Geburt auf die Anwesenheit von WT- und transgenen Gephyrin-Allelen untersucht. Hierzu wurden zwei verschiedene Primerpaare in einer PCR-Reaktion verwendet. Die DNA-Proben zur Genotypisierung wurden zuvor aus den Schwanzspitzen der Tiere isoliert. Bei der PCR-Reaktion zum Nachweis des WT-Gephyrin-Gens entstehen Amplikons mit einer

Größe von 350 bp, sofern mindestens ein solches Allel vorhanden ist. Die PCR-Reaktion zur Identifikation von transgenen Tieren amplifiziert ein 450 bp-DNA-Fragment der Neomycin-Kassette aus KO-Allelen. Die Größe der entstandenen Amplikons wird über Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender DNA-Färbung bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen der 2. Mendelschen Regel eines dominant-rezessiven-Erbgangs, da es sich bei den Tieren um die F2-Generation einer Heterozygoten-Verpaarung handelte und bereits die Anwesenheit eines Gephyrin-Allels zum Verlust des KO-Phänotyps führt. Somit beträgt das rechnerische Verhältnis von WT- zu heterozygoten zu KO-Tieren nach Mendel 1:2:1. Es waren mehrere Verpaarungen nötig, um auf die beschriebene Weise drei Cortices reinerbiger WT- und drei Cortices reinerbiger Gephyrin-KO-Tiere zu sammeln (siehe **Abb. 22**).

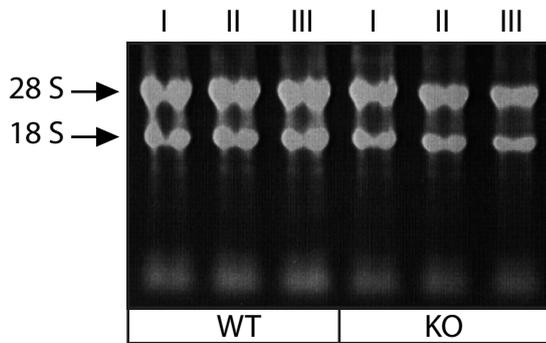


**Abb. 22:** Genotypisierung von Jungtieren aus einer Verpaarung von Gephyrin-heterozygoten Mäusen. 1-7: 7 verschiedene Mäuse. Negativkontrolle: Wasser statt DNA-Template für die PCR-Reaktion. Es wurden je 10 µl PCR-Produkt pro Spur aufgetragen und die entstehenden Banden mit einem DNA-Standard (M) verglichen. 1,3: WT; 2,4,5,6,: heterozygot; 7: KO

### 3.4.2. RNA-Aufreinigung aus Maus-Cortices

Der vollständige Verlust des Gephyrin-Gens ist für Mäuse am Tag der Geburt letal (Feng *et al.*, 1999). Um genügend Gewebe sammeln zu können, wurden die Cortices von Mäusen eines Wurfes aus Heterozygoten-Verpaarungen direkt nach der Geburt präpariert. Diese wurden anschließend in nummerierte Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach erfolgter Genotypisierung der präparierten Mäuse konnte jedem Hirnpräparat ein Genotyp zugeordnet werden.

Aus den Cortices von drei WT- und drei Gephyrin-KO-Mäusen wurde in separaten Ansätzen die RNA mit TRIzol™ Reagenz aufgereinigt. In einem Agarose-Gel wurden gleiche Volumina der sechs RNA-Präparationen aufgetrennt. Hierbei wurden zwei prominente Banden bei 4700 bp und bei 1900 bp in jeder Spur sichtbar (siehe **Abb. 23**). Diese Banden entsprechen der ribosomalen 28 S bzw. der 18 S rRNA. Ihre Anwesenheit und die geringe Degradation können als Qualitätsmerkmale einer gelungenen Präparation angesehen werden.



**Abb. 23: Qualitätskontrolle der aufgereinigten RNA.** Die RNA aus den Cortices von 3 WT- und 3 Gephyrin-KO-Mäusen wurde über ein 1%iges Agarose-Gel aufgetrennt. Es wurde je 1 µg RNA pro Spur aufgetragen. I-III: Unabhängige RNA-Präparationen

### 3.4.3. Expressionschip-Daten

Die sechs RNA Präparationen (siehe 3.4.2.) wurden zur weiteren Analyse mit der Expressionsmicroarray-Methode zu Dr. Bernd Denecke an die RWTH Aachen geschickt. Dort wurden die original RNA-Proben mit Biotin markiert und anschließend mit jeweils einem Affymetrix® Exon-Array Expressionschip hybridisiert und mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt. Die Daten aus den sechs Expressionschips wurden im Labor von Dr. Bernd Denecke mit einem Affymetrix® GeneChip® Scanner 3000 ausgelesen, in Gruppen zusammengeführt (WT vs. KO) und statistisch ausgewertet. Hierbei wurde die Expressionsstärke sämtlicher Maus-Gene untersucht. Als Ergebnis dieser Analyse wurde eine Liste mit Werten für 16662 Transkripte an uns übergeben.

Hier werden nur Werte für Transkripte gezeigt, welche in einem t-Test einen p-Wert < 0,002 aufwiesen, also im Vergleich zwischen WT- und KO-Tieren hochsignifikant verschieden sind. Die Auswahl dieser Gene wurde nach der Größe des p-Wertes sortiert (siehe **Tabelle 2**). Die Analyse der Daten aus dem Expressionsarray zielte darauf ab, Gene zu identifizieren, deren Expression durch den Verlust des Gephyrin-Gens vermehrt oder vermindert wird. Der Eintrag von Gephyrin an erster Stelle weist auf die Richtigkeit der ausgelesenen Daten hin, da die KO-Mäuse keine Gephyrin-Transkripte exprimieren (Feng *et al.* 1998). Die Änderungsfaktoren der anderen Transkripte in Tabelle 2 liegen zwischen 1,5 und 2,0; deren Expression ist somit maximal um den Faktor 2 verändert. Verglichen mit Gephyrin sind diese Veränderungen sehr gering. Deshalb wurde die Anwesenheit von Transkripten besonders interessanter Gene zusätzlich mittels RT-PCR bestätigt. Zur diesen Genprodukten zählen Acp1 (Acid Phosphatase 1), EFA6 (Exchange Factor for ARF6) und Frabin/Fgd4 (FYVE, RhoGEF and PH domain containing protein 4). Acp1 wurde gewählt, da neue pharmakologische Studien darauf hinweisen, dass die Gephyrinverteilung in Neuronen über Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungs-Mechanismen gesteuert wird (Bausen *et al.*, 2010). Bei EFA6 und Frabin/Fgd4 handelt es

sich um Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), welche ähnlich wie Collybistin die Gephyrinaggregation an Synapsen regulieren könnten.

**Tabelle 2: Transkripte im Vorderhirn der Maus, welche durch den KO des Gephyrin-Gens verändert exprimiert sind.**

#	p-Wert	Faktor	Transkript ID	Bezeichnung des Gens
<b>1</b>	<b>0,00000004</b>	<b>-20,630</b>	<b>NM_172952</b>	<b>Gephyrin (Geph)</b>
2	0,00016	-1,986	NM_177670	Transmembrane Protein 69 (Tmem69)
3	0,00032	-1,693	NM_139146	Special AT-rich Sequence Binding Protein 2 (Satb2)
4	0,00037	-1,862	NM_175446	RIKEN cDNA B930008K04 gene
5	0,00053	-1,591	NM_172882	WD Repeat and FYVE Domain Containing 3 (Wdfy3)
<b>6</b>	<b>0,00055</b>	<b>+1,857</b>	<b>NM_021330</b>	<b>Acid Phosphatase 1 (Acp1)</b>
7	0,00078	-1,621	NM_146020	RIKEN cDNA C730027E14 gene
8	0,00092	-1,986	NM_023507	RIKEN cDNA 0610007P08 gene
9	0,00100	-1,643	NM_177244	FAST Kinase Domains 1 (Fastkd1)
10	0,00102	-1,794	NM_026913	Microtubule Interacting and Transport domain containing 1 (Mitd1)
11	0,00106	-1,659	NM_145568	Lysine-Rich Coiled-Coil 1 (Krcc1)
12	0,00113	-1,753	NM_026149	NudC Domain Containing 1 (Nudcd1)
<b>13</b>	<b>0,00113</b>	<b>-1,693</b>	<b>NM_139232</b>	<b>FYVE, RhoGEF and PH Domain Containing 4 (Fgd4 / Frabin)</b>
14	0,00123	-1,991	NM_027921	Monocarboxylic Acid Transporters Member 14 (Slc16a14)
15	0,00125	+1,832	NM_008742	Neurotrophin 3 (Ntf3)
16	0,00129	-1,737	NM_008715	Integrator Complex Subunit 6 (Ints6)
17	0,00131	-1,580	NM_011897	Sprouty Homolog 2 (Spry2)
18	0,00133	-1,544	NM_023718	Solute Carrier Family, Member 1a6 (Slco1a6)
19	0,00135	+1,569	AY262012	Ndufa12-like (Ndufa12l)
20	0,00148	-1,502	XM_916781	RIKEN cDNA B230315N10 gene
21	0,00149	-1,625	NM_010191	Farnesyl Diphosphate Farnesyl Transferase 1 (Fdft1)
22	0,00158	-1,523	AK046862	RIKEN cDNA 1810047C23 gene
23	0,00163	-1,474	BC055708	Polybromo 1 (Pb1)
<b>24</b>	<b>0,00168</b>	<b>-1,923</b>	<b>AK147606</b>	<b>Pleckstrin and Sec7 Domain Containing 3 (Psd3 / EFA6)</b>
25	0,00177	-1,562	NM_010883	Norrie disease homolog (Ndph)
26	0,00199	-1,509	NM_029610	LYR Motif Containing 1 (Lyrm1)

Der Faktor gibt die x-fache Änderung der gemessenen Transkriptmengen von WT zu KO an. Faktor < 0: bei KO runterreguliert; Faktor > 0: bei KO raufreguliert.

### 3.4.4. RT-PCR von Kandidatengen

Der Datensatz aus dem untersuchten Chip beinhaltet mehrere Gene, welche in geringem Umfang reguliert werden, sich jedoch als hochinteressant erweisen könnten, falls sich ein funktioneller Zusammenhang zwischen ihnen und Gephyrin bestätigen ließe. Daher wurde hier zunächst die Anwesenheit der mRNAs von den unter 3.4.3. genannten Genen mittels RT-PCR bestätigt. Hierzu wurden 2 µg RNA mit DNase I verdaut, um Verunreinigungen der Probe mit DNA auszuschließen (siehe 2.2.8.). Die reine RNA-Probe wurde unter Verwendung von zufälligen Hexameren und einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese komplementäre DNA wurde nun in PCR-Reaktionen zum Nachweis der Zielgene eingesetzt (siehe 2.2.9.3.).

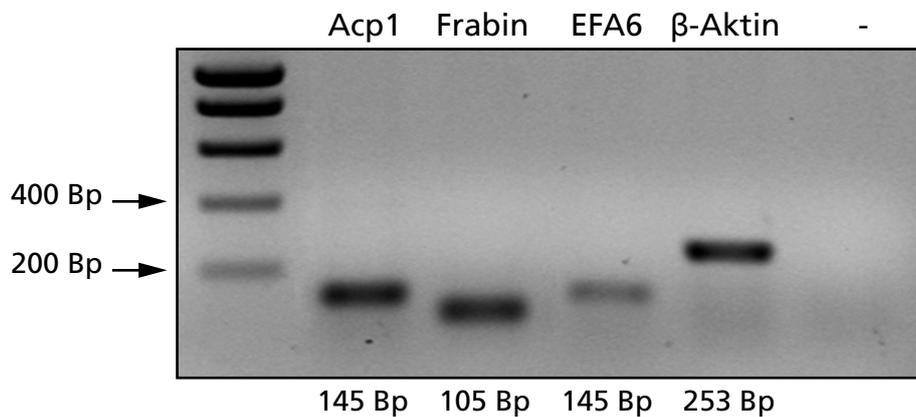


Abb. 24: RT-PCR von Kandidatengenen aus den Cortices von WT-Mäusen. Es wurden je 10 µl PCR-Produkt pro Spur aufgetragen und über ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetrennt. In der Negativkontrolle (-) wurde Wasser statt cDNA-Template in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Amplifikation von  $\beta$ -Aktin dient als Positivkontrolle.

Abb. 24 zeigt, dass drei ausgewählte Gene in der für den Chip verwendeten Probe exprimiert wurden. Durch die RT-PCR entstehen DNA-Fragmente mit den respektiven Größen einer Amplifikation aus cDNA. Weitere Fragmente höheren Molekulargewichts, welche aus Verunreinigungen mit genomischer DNA hätten entstehen können, wurden nicht beobachtet. Das als Haushaltsgen in jedem Gewebe exprimierte  $\beta$ -Aktin wurde als Positivkontrolle für die Reaktion verwendet. Als Negativkontrolle wurde Wasser statt cDNA in die PCR-Reaktion eingesetzt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Gene tatsächlich im Mauscortex exprimiert werden.

### 3.4.5. Weitere Untersuchungen der Kandidatengene

Weitere Aussage über die Regulierung von Genen durch den Knockout lassen sich durch RT-PCR nicht erzielen. Dafür sind Methoden zur quantitativen Bestimmung von Transkripten erforderlich. Hier wurde die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) verwendet, durch deren Gebrauch sich Informationen über den mRNA Gehalt einer Probe gewinnen lassen (siehe 2.2.9.4.). Die bei der Untersuchung im Microarray gefundenen Veränderungen in den mRNA-Mengen von Frabin und EFA6 konnten mittels qRT-PCR jedoch nicht reproduziert werden. Geringe Unterschiede (weniger als 2-fach) sind mit qRT-PCR aber generell nur schwer nachzuweisen. Dies liegt in erster Linie an der Ungenauigkeit der PCR-Effizienz-Bestimmung. Abweichungen der gemessenen PCR-Effizienz von wenigen Prozentpunkten sind ausreichend, um die Berechnung von Transkriptmengen um ein Vielfaches zu ändern. Geringfügige Unterschiede in mRNA-Expressionen werden so von einer relativ großen Standardabweichung überlagert und können nicht eindeutig nachgewiesen werden. (Rajeevan *et al.*, 2001; Mutch *et al.*, 2002)

Neben der Bestätigung der Expressionsarray-Ergebnisse mittels qRT-PCR wurden zwei der ausgewählten Genprodukte auf funktionelle Interaktion mit Gephyrin überprüft. Hierzu

wurden Frabin und EFA6 in HEK293T Zellen zusammen mit GFP-Gephyrin exprimiert. Außerdem wurden auch hippocampale Neuronen mit Frabin- und EFA6-cDNA transfiziert. Ein Einfluß auf die Menge oder Verteilung von Gephyrin in der Zelle, oder eine Kolokalisation der untersuchten Proteine, konnte nicht beobachtet werden. Keiner der durchgeführten Versuche ergab Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Gephyrin und Frabin bzw. EFA6 (Daten nicht gezeigt).

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Ansätze zur Analyse von Gephyrin und GlyRs an inhibitorischen Synapsen des Säugerhirns bearbeitet. Ein Ziel hierbei war die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers, welcher selektiv die  $\beta$ -Untereinheit von GlyRs erkennt, und Analysen zur Verteilung des GlyR $\beta$ -Proteins im Säugerhirn ermöglichen sollte. In weiteren Projekten wurde der Einfluss von Phosphorylierungen auf Gephyrin untersucht bzw. potentielle genregulatorische Funktionen von Gephyrin, durch Genom-weite Expressionschip-Analysen von Hirnproben aus WT- und Gephyrin-KO-Mäusen, analysiert.

### 4.1. Ein monoklonaler Antikörper gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit

Durch die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit und dessen Etablierung für eine Reihe immunchemischer Färbemethoden, ist es nun erstmals möglich, GlyR $\beta$ -Protein in Zellen und Geweben spezifisch nachzuweisen. Bislang waren Untersuchungen zur Expression von GlyR $\beta$  stets auf die Analyse der RNA angewiesen. Mit dem in dieser Arbeit hergestellten Antikörper steht nun ein Werkzeug zur Verfügung, mit Hilfe dessen sich die Verteilung von GlyR $\beta$  erstmals auf Proteinebene untersuchen lässt und somit die Problematik möglicher posttranskriptionaler Regulation der Expression umgangen wird. Da diese Untereinheit vermutlich in allen heteromeren GlyR-Komplexen des adulten Zentralnervensystems vorkommt und auch die Bindung an das essentielle Rezeptor-Clustering-Protein Gephyrin vermittelt, ist dieser Antikörper von hoher Bedeutung für zukünftige Untersuchungen an inhibitorischen Synapsen.

#### 4.1.1. Validierung der Antikörperspezifität

Das Epitop des neuen monoklonalen Antikörpers gegen GlyR $\beta$  befindet sich innerhalb der ersten 20 Aminosäuren des GlyR $\beta$ loop (siehe 3.1.5. und 3.1.6.). Diese Proteinsequenz ist in Säugern sehr stark konserviert. Obwohl der Antikörper gegen GlyR $\beta$  aus Ratte hergestellt wurde, kann er für andere Spezies wie z.B. Maus (100% Epitopsequenz-Identität) und wahrscheinlich auch Mensch (100% Epitopsequenz-Identität) erfolgreich verwendet werden.

Die ELISA-Tests mit Hybridomaüberständen zeigten, dass die Antikörper der Mischklone 170 und 299 eine vergleichsweise starke Bindung an GlyR $\beta$ loop-Peptid aufweisen. Über die unterschiedlich starken Färbungen der Überstände in den Western Blots (siehe 3.1.2.) lässt sich jedoch nicht direkt auf die Bindungsaffinitäten der Antikörper schließen, da für die getesteten Western-Blot-Membranen nicht gegeben war, dass sie die gleiche Menge Protein gebunden

haben. Insgesamt wurde durch die gezeigten Western Blots deutlich, dass einige der hergestellten Antikörper an GST binden (**Abb. 2, B2**) und die Anwesenheit von Zelllysaten die Bindung mancher Antikörper störte. Lediglich die Antikörper der Klone 170 und 299 erkannten GlyR $\beta$ loop und GlyR $\beta$ loop-Fusionsprotein auch in Anwesenheit von Zelllysaten und GST-Protein.

Die Spezifität des monoklonalen Antikörpers konnte durch Western Blot-Analysen mit endogenen Glycinrezeptoren aus Rattenrückenmark und auch durch Färbung transfizierter HEK293T-Zellen demonstriert werden. Bei diesen Versuchen wurden auch bereits etablierte Antikörper zu Kontrollzwecken eingesetzt, wie der mAb4a-Antikörper. Das eigentliche Epitop dieses Antikörpers liegt zwischen AS 96 und 105 der GlyR $\alpha$ 1-Untereinheit. Dementsprechend färbte er in den Western Blots endogener GlyRs lediglich eine Bande von etwa 48 kDa, was der Größe von GlyR $\alpha$  entspricht, und dessen Degradationsprodukte (siehe 3.1.4.). In einem weiteren unter 3.3.7. gezeigten Experiment wurde GlyR $\beta$  in HEK293T-Zellen überexprimiert. Bei hohen Proteinkonzentrationen wird auch GlyR $\beta$  gut durch mAb4a-Färbung erkannt (Heinze *et al.*, 2007). Grund hierfür ist die außerordentlich hohe Sequenzhomologie zwischen GlyR $\alpha$ - und GlyR $\beta$ -Untereinheit (ein Aminosäureaustausch in der Epitopregion von mAb4a in GlyR $\beta$ ). Im Gegensatz hierzu erkannte der neu hergestellte mGlyR $\beta$ -Antikörper in allen durchgeführten Experimenten spezifisch GlyR $\beta$  und wies keinerlei Kreuzreaktivitäten zu GlyR $\alpha$ -Proteinen auf. Außerdem konnte, durch die Zugabe des 20 AS langen Epitop-Peptids zum mGlyR $\beta$ -Antikörper, die Färbung von Western Blot-Analysen, Zellkulturen und Hirnschnitten effizient verhindert werden.

Der Antikörper gegen GlyR $\beta$  wurde an Primärkulturen und Schnittpräparaten aus Ratten und Maus ZNS auf seine Tauglichkeit in immunocytochemischen Färbungen überprüft (siehe 3.1.8.). Die nach Färbung sichtbaren immunreaktiven Punkte waren gegenüber inhibitorischen Präsynapsen lokalisiert und überlagerten in Doppelfärbungen zum großen Teil mit Gephyrin. Interessanterweise wurden GlyR-Cluster nur in älteren Rückenmarkskulturen ab dem 20. Tag nach der Präparation (DIV20) durch den GlyR $\beta$ -spezifischen Antikörper erkannt. Im Gegensatz hierzu können GlyR-Punkte durch andere GlyR-spezifische Antikörper wie mAb4a bereits in jüngeren Kulturen (DIV6-12) nachgewiesen werden (Kirsch *et al.*, 1993). Die Beobachtung, dass mGlyR $\beta$  diese Cluster nicht färbt, weist darauf hin, dass GlyRs in jungen Neuronen in neonatalen isoformen, also ohne GlyR $\beta$ -Untereinheiten vorliegen, und somit zu diesem Zeitpunkt die GlyR $\beta$ -Konzentration so niedrig ist, dass sie durch diesen Antikörper nicht detektiert werden kann. Dafür sprechen auch biochemische Studien an vergleichbaren Rückenmarkskulturen, in denen hauptsächlich neonatale GlyRs, also  $\alpha$ -Untereinheiten, aufgereinigt werden konnten,

jedoch keine oder nur sehr geringe Mengen der  $\beta$ -Untereinheit von 58 kDa (Hoch, 1989). Um diese Hinweise weiter zu stärken, müssten Färbungen von Kulturen verschiedenen Alters vorgenommen und im Idealfall durch elektrophysiologische Messungen von GlyR-Strömen vervollständigt werden.

#### 4.1.2. Lokalisation von GlyR $\beta$ im Zentralnervensystem der Maus

Aufgrund der erfolgreichen Herstellung des monoklonalen Antikörpers gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit (mGlyR $\beta$ ) im Rahmen dieser Arbeit, konnte erstmals die Verteilung von GlyR $\beta$ -Protein im Säugerhirn untersucht werden. Immunhistochemische Färbungen von GlyR $\beta$  zeigten ein Verteilungsmuster, welches stark von dem in mRNA-Hybridisierungsstudien ermittelten abwich. Erste Erkenntnisse über die Verteilung von Glycinrezeptor-mRNA waren durch Northern Blot-Analysen von Homogenaten unterschiedlicher Hirnregionen gewonnen worden (Grenningloh *et al.*, 1987, 1990). Für GlyR $\alpha$ 1 konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass die mRNA-Expression im Ratten- und Mausgehirn auf Rückenmark und Hirnstamm beschränkt ist und erst in postnatalen Geweben auf detektierbare Mengen ansteigt (Grenningloh *et al.*, 1987; Malosio *et al.*, 1990). *In situ* Hybridisierungen und Northern Blot-Studien zeigten für GlyR $\beta$ -mRNA hingegen eine breite Expression im ganzen Gehirn mit einem Beginn der Expression bereits in pränatalen Entwicklungsstadien (Grenningloh *et al.*, 1990; Fujita *et al.*, 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass GlyR $\beta$ -Protein, im Gegensatz zur mRNA, in seiner Verteilung hauptsächlich auf Rückenmark und Hirnstamm beschränkt ist (siehe 3.1.9. und 3.1.10.). Geringere Mengen GlyR $\beta$  konnten auch im Bulbus olfactorius und im entorhinalen Cortex detektiert werden. Das gefundene GlyR $\beta$ -Protein-Expressionsschema deckt sich nicht mit der GlyR $\beta$ -Transkript-Verteilung aus vorherigen Studien (Malosio *et al.*, 1991b; Fujita *et al.*, 1991), da in vielen Hirnregionen zwar GlyR $\beta$ -mRNA gefunden, aber kein GlyR $\beta$ -Protein nachgewiesen werden konnte. Vielmehr ähnelt die GlyR $\beta$ -Proteinverteilung dem Expressionsschema der GlyR $\alpha$ 1-Untereinheit, sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene (Grenningloh *et al.*, 1987; Malosio *et al.*, 1991b; Sato *et al.*, 1991). Daher scheint es möglich, dass GlyR $\alpha$ 1 zu einer Stabilisierung von GlyR $\beta$ -Protein notwendig ist und daher nur in jenen Hirnregionen detektierbare GlyR $\beta$ -Proteinmengen akkumulieren, in denen GlyR $\alpha$ 1 und GlyR $\beta$  zusammen exprimiert werden. Gegen diese Erklärung spricht, dass sich GlyR $\beta$ -Protein bei Überexpression in HEK293T-Zellen in detektierbaren Konzentrationen im ER ansammelt, wenn es nicht mit  $\alpha$ -Untereinheiten assembliert und zur Plasmamembran transportiert wird. Im ER von Neuronen konnte jedoch bei Überexpression keine Erhöhung der  $\beta$ -spezifischen

Immunreaktivität festgestellt werden. Färbungen lassen sich häufig leichter an Synapsen erkennen, da es im Nukleus von Neuronen oft zu Kreuzreaktivitäten vom Antikörpern und Chromatin kommt. Daher könnten schwache Signale im Zellkörper/Soma durch derartige Hintergrundfärbungen überstrahlt und deshalb nicht detektiert werden. Ebenso denkbar wäre jedoch auch die Existenz eines unbekannter Kontrollmechanismus zwischen Transkription und Translation, welcher gewährleistet, dass GlyR $\beta$ -mRNA nur in Zellen translatiert wird, in denen auch GlyR $\alpha$ -Protein zur Assemblierung in funktionale Rezeptor-Komplexe zur Verfügung steht. Alternativ könnte in Neuronen unassembliertes GlyR $\beta$ -Protein schnell abgebaut werden. Bislang ist nicht klar inwieweit GlyR $\beta$ -Protein in anderen Hirnregionen tatsächlich nicht vorhanden ist oder lediglich in Mengen unterhalb der Detektionsgrenze des Antikörpers gebildet wird. Elektrophysiologische und immunhistochemische Studien zeigen die Expression von GlyRs auch im Hippocampus (Chattipakorn *et al.*, 2002; Danglot *et al.*, 2004). Ein direkter Nachweis von GlyR $\beta$ -Protein in dieser Hirnregion konnte hier jedoch nicht erbracht werden. Eine kürzlich veröffentlichte elektrophysiologische Studie enthält Hinweise auf heteromere, also GlyR $\beta$ -enthaltende GlyRs an Präsynapsen von Moosfasern im Hippocampus (Kubota *et al.*, 2010). Dennoch zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Antikörperfärbungen von GlyR $\beta$  im Hippocampus nur ein minimales diffuses Signal im Vergleich zum Hintergrund (siehe 3.1.10.). Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass auf Moosfasern lokalisierte GlyRs präsynaptisch lokalisiert sind und nicht durch Gephyrin geclustert werden. Diffus verteiltes Protein ist in immunhistochemischen Färbungen wesentlich schwieriger nachzuweisen als an Synapsen angereichertes Protein. Eine Kombination verschiedener immunocytochemischer und elektrophysiologischer Methoden zur Untersuchung der Verteilung funktionaler GlyRs im Säugerhirn sollte daher das Ziel zukünftiger Forschung sein.

#### **4.1.3. Färbung von GlyR $\beta$ in der Mausretina**

Die vergleichenden Färbungen von GlyRs in der Retina von Mäusen (siehe 3.2.1.) passen zu der Annahme, dass alle glycinergen Synapsen in adulten Säugern postsynaptische heteromere GlyR-Komplexe aufweisen, die aus GlyR $\alpha$  und GlyR $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut sind (Meyer *et al.*, 1995; Aguayo *et al.*, 2004; Grudzinska *et al.*, 2005). Denn durch parallele Färbungen mit mAb4a, welcher alle GlyR-Untereinheiten bindet, und dem GlyR $\beta$ -spezifischen Antikörper, wurden vergleichbar viele Synapsen gefärbt. Außerdem entsprach die Verteilung von GlyR $\beta$ -Punkten in der Retina grundsätzlich dem bekannten Verteilungsmuster der einzelnen GlyR $\alpha$ -Untereinheiten (Wässle *et al.*, 1998; Haverkamp & Wässle 2000). Des weiteren wurde für

GlyR $\beta$  in der Retina bestätigt, dass es mit Gephyrinpunkten kolokalisiert (siehe 3.2.2.). Dies passt dazu, dass Gephyrin direkt an GlyR $\beta$  bindet und diese Interaktion die Grundlage effizienter glycinerner Transmission in reifen Synapsen ist (Meyer *et al.*, 1995; Fritschy *et al.*, 2008).

#### 4.1.4. Kolokalisation von GlyR $\beta$ und Gephyrin mit GlyR $\alpha$ 1-4 in der Mausretina

Aufgrund seiner klar strukturierten Gewebsarchitektur ist die Retina ein ideales Modellgewebe zur Untersuchung von glycinergen Synapsen mittels Antikörperfärbung. Die Verteilungsmuster synaptischer GlyR $\alpha$ -Untereinheiten in der Retina wurden bereits eingehend beschrieben (Sassoé-Pognetto *et al.*, 1994; Haverkamp *et al.*, 2003, 2004; Heinze *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen von GlyR $\alpha$ -Untereinheiten bestätigen und erweitern die Ergebnisse dieser früheren Studien (siehe 3.2.4.). Bei Doppelfärbungen von GlyR $\alpha$ 4 und GlyR $\beta$  fiel jedoch auf, dass in einer bestimmten Region der IPL, zwischen Stratum 3 und 4, vermehrt Synapsen GlyR $\alpha$ 4-positiv, jedoch negativ in der GlyR $\beta$ -Färbung waren (siehe 3.2.3.). Die geringe Kolokalisation von GlyR $\alpha$ 4- und GlyR $\beta$ -Signal könnte ein Hinweis auf GlyR $\alpha$ 4-enthaltende Rezeptorkomplexe sein, welche keine GlyR $\beta$ -Untereinheiten enthalten. Eine derartige Hypothese steht im klaren Widerspruch zur bisherigen Annahme, dass an reifen Synapsen generell GlyR $\alpha/\beta$ -Heteromere vorliegen und nur GlyR $\beta$ -enthaltende Komplexe über Gephyrin in Clustern angereichert werden können (Hoch *et al.* 1989; Laube *et al.* 2002; Kneussel & Loeblich, 2007). Die Tatsache, dass in der gleichen Region ein ähnlich hoher Anteil der GlyR $\alpha$ 4-positiven Synapsen auch kein Gephyrin enthält, unterstützt die Vermutung, dass es hier einen alternativen Clustermechanismus gibt. Eine vorangegangene Studie zeigte bereits, dass ein Teil von axonal gelegenen Postsynapsen auf Zapfen-Bipolarzellen in der Retina GlyR $\alpha$ 1-Cluster aufweist, welche jedoch in Färbungen mit dem Gephyrin-spezifischen Antikörper mAb7a nicht sichtbar werden (Sassoé-Pognetto *et al.*, 1994). Diese Tatsache wurde dadurch zu erklären versucht, dass die mRNA von Gephyrin einem komplexen Spleiß-Prozess unterliegt (Paarmann *et al.*, 2006a) und es daher möglich sein könnte, dass mAb7a einige Gephyrin-Spleißvarianten nicht erkennt. Über das Epitop des mAb7a-Antikörpers ist bekannt, dass es nah an der Membran, vermutlich in der Gephyrin E-Domäne liegt (Triller *et al.*, 1985; Sola *et al.*, 2004). Die E-Domäne selbst unterliegt in neuronalen Geweben jedoch einem einheitlichen Spleiß-Prozess und weist demnach eine uniforme Primärstruktur auf (Paarmann *et al.*, 2006b). Andererseits ist auch bekannt, dass das differentielle Spleißen in der die N-terminale Domäne von Gephyrin kodierenden Sequenz die Bindung der C-terminal gelegenen E-Domäne an GlyRs beeinflussen kann. Daher ist es denkbar, dass Spleiß-Prozesse der Gephyrin-mRNA die

Bindungsaffinität des mAb7a-Antikörpers beeinflussen könnten, auch wenn sie nicht an oder in direkter Nähe der Epitopsequenz erfolgen. In Bezug auf GlyR $\beta$  ist derzeit lediglich eine weitere Spleißvariante bekannt (Oertel *et al.*, 2006), in welcher das Epitop des mGlyR $\beta$ -Antikörpers jedoch unverändert ist. Da diese Spleißvariante hauptsächlich in nicht-neuronalen Geweben vorkommt, kann man auch hier davon ausgehen, dass alternatives Spleißen nicht die Ursache für die fehlende GlyR $\beta$ -Färbung in der Retina sein kann. Die hier beobachtete Färbung von GlyR $\alpha$ 4-Clustern, welche weder mit Gephyrin noch mit GlyR $\beta$  kolokalisieren, ist also wohl nicht auf eine unvollständige Detektion dieser Proteine durch die verwendeten Antikörper zurückzuführen. Andererseits wurden in elektrophysiologischen Untersuchungen der betroffenen Zelltypen in der Retina eindeutig Ströme von GlyR $\alpha$ 1/ $\beta$ -Heteromeren gemessen (Ivanova *et al.*, 2006). Diese könnten jedoch auch durch diffuse, präsynaptische GlyRs verursacht werden und sind daher kein Beleg für die Anwesenheit postsynaptischer GlyR $\beta$ -Cluster in dieser Region.

In Bezug auf  $\beta$ -freie GlyR-Komplexe ist bekannt, dass in pränatalen Entwicklungsstadien GlyR $\alpha$ 2-Homomere dominieren und erst später durch  $\beta$ -enthaltende Heteromere ersetzt werden, jedoch gibt es bislang keine Beweise, dass diese GlyR $\alpha$ 2-Homomere synaptisch geclustert sind und auch im adulten Tier vorkommen (Deleuze *et al.*, 2005). Vielmehr wurde gefunden, dass GlyR $\alpha$ 2-Homomere aufgrund ihrer langsamen Kinetik die synaptische Transmission stören würden (Singer *et al.*, 1998; Mangin *et al.*, 2003). Daher geht man davon aus, dass derartige GlyR $\alpha$ 2-Homomere, sofern sie in reifen Neuronen existieren, extrasynaptisch lokalisiert vorliegen. Die im Rahmen dieser Arbeit gefärbten GlyR $\alpha$ 4-Untereinheiten sind in Punkten angereichert, liegen also vermutlich in Synapsen geclustert vor. Das einzige bekannte Glycinrezeptor-Gerüst-Protein, Gephyrin, bindet Rezeptorkomplexe über eine direkte Interaktion mit der  $\beta$ -Untereinheit. Gephyrin ist jedoch ebenfalls in einem großen Anteil von GlyR $\alpha$ 4-Clustern in Stratum 3/4 der IPL nicht nachweisbar (siehe 3.2.4. und Heinze *et al.*, 2007). Da in beiden Studien der gleiche polyklonale Antikörper gegen GlyR $\alpha$ 4 verwendet wurde, ist es möglich, dass Proteine unspezifisch gefärbt wurden. Die Überlagerungsbilder von GlyR $\alpha$ 4 und dem GlyR-spezifischen Antikörper mAb4a (siehe 3.2.5.) demonstrieren jedoch, dass alle GlyR $\alpha$ 4-gefärbten Punkte auch GlyRs enthalten, was dieser Annahme widerspricht. In Neuronen gibt es drei denkbare Rezeptorverteilungsmuster: diffus über die Membran verteilt, in extrasynaptischen Clustern angereichert und in synaptischen Clustern angereichert. Da Färbungen von GlyR $\alpha$ 4 punktförmige Signale aufweisen (siehe 3.2.1.) stellte sich die Frage, ob diese Cluster extrasynaptisch oder an Synapsen lokalisiert sind. Wie bereits erwähnt, gilt die Anreicherung von GlyR $\alpha$ -Homomeren an der Synapse anhand elektrophysiologischer Daten zumindest für GlyR $\alpha$ 2 als unwahrscheinlich

(Mangin *et al.*, 2003). Doppelfärbungen von GlyR $\alpha$ 4 mit dem präsynaptischen Markerprotein Bassoon zeigten jedoch die klare synaptische Lokalisation von GlyR $\alpha$ 4, auch in Regionen, in denen nur etwa 50 % der GlyR $\alpha$ 4-positiven Synapsen auch GlyR $\beta$  oder Gephyrin enthalten (siehe 3.2.6.). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass GlyRs an Synapsen angereichert werden können, auch wenn sie kein GlyR $\beta$  enthalten und nicht mit Gephyrin assoziiert sind.

#### **4.1.5. Implikationen für die GlyR-Zusammensetzung an ON-Starburst-Amakrinzellen**

Die GlyR $\alpha$ 4, jedoch nicht GlyR $\beta$  enthaltenden glycinergen Synapsen wurden besonders häufig zwischen den Strata 3 und 4 der IPL gefunden (siehe 3.2.3.). In dieser Region werden GlyR $\alpha$ 4-exprimierende, vermutlich cholinerge ON-Starburst-Amakrinzellen von glycinergen Amakrinzellen innerviert (Heinze *et al.*, 2007). Über GlyR $\alpha$ 4-enthaltende Rezeptorcluster, welche kein GlyR $\beta$  enthalten, gibt es bislang keine physiologischen Daten. Indirekte Hinweise wurden durch Ganzzell-Patch-Messungen an ON-Starburst-Amakrinzellen erzielt, welche auffällig langsame Rezeptorkinetiken aufweisen (Majumdar *et al.*, 2009; Wässle *et al.*, 2009), was wiederum zur Kinetik von GlyR $\alpha$ 4-enthaltenden Rezeptoren passt. Funktionell können ON-Starburst-Amakrinzellen nicht gänzlich eingeordnet werden. Es scheint jedoch klar zu sein, dass Starburst-Amakrinzellen in spezielle Verarbeitungsprozesse involviert sind, welche für richtungsselektive Ganglienzellen vermutlich essentiell sind (Vaney & Taylor, 2002; Euler *et al.*, 2002; Hausselt *et al.*, 2007).

Starburst-Amakrinzellen erhalten glutamaterge, GABAerge und glycinerge Eingänge, vermutlich von anderen Amakrinzellen (Zhou *et al.*, 1995), und schütten die Transmitter Acetylcholin und auch GABA durch vesikuläre Exocytose aus (Zheng *et al.*, 2004). Die Art und Weise, auf die richtungsselektive Verarbeitung in diesen Zellen passiert, ist zum großen Teil unklar. Vermutlich handelt es sich jedoch um eine lokale, rein dendritische Verarbeitung eintreffender Reize, welche Kalzium als Botenstoff und nicht Aktionspotentiale zur intrazellulären Signalweitergabe nutzt (Euler *et al.*, 2002), wie es beispielsweise auch für A17-Amakrinzellen in der Retina gezeigt wurde (Grimes *et al.*, 2010). Die Lokalisation der Synapsen auf den weit zwischen unterschiedlichen Strata verzweigten Amakrinzell-Dendriten ist somit essentiell für diese lokale Verarbeitung von Signalen. Man vermutet hierbei eine sogenannte serielle Anordnung von Synapsen, welche die Verarbeitung von richtungsselektiven Reizen ermöglicht (Euler *et al.*, 2002; Enciso *et al.*, 2010). Leider gibt es bis heute keine Daten über die exakte Verteilung GlyR $\alpha$ 4-enthaltender Rezeptorcluster auf den Dendriten dieser Zellen. In zukünftigen Experimenten könnten Starburst-Amakrinzellen durch Cholin-Acetyltransferase-Färbung oder

besser noch durch Injektion von Farbstoffen markiert und das Verteilungsmuster der GlyR $\alpha$ 4-Cluster durch eine nachfolgende Antikörperfärbung zu analysiert werden. Ebenfalls interessant wäre es, diesen Zelltyp an GlyR $\alpha$ 4-defizienten Mäusen elektrophysiologisch zu untersuchen. Ohne derartige Daten ist die Bedeutung dieser neuartigen Rezeptorzusammensetzung für die Richtungsselektivität schwer abzusehen.

Den Befund, dass synaptische GlyR $\alpha$ -Rezeptoren in adulten Säugern nicht mit GlyR $\beta$ -Untereinheiten komplexiert vorliegen und außerdem nicht mit Gephyrin geclustert sind, hat es so bislang nicht gegeben. Um eine Anreicherung von GlyR $\alpha$ 4 an Synapsen in Abwesenheit von Gephyrin zu erhärten, sind elektronenmikroskopische Studien notwendig. Außerdem wäre es hochinteressant zu testen, wie sich ein Verlust von Gephyrin auf diese potentiell Gephyrin-freien GlyR-Cluster auswirkt. Hierzu könnten beispielweise organotypische Retinakulturen von neonatalen Gephyrin-KO-Mäusen angelegt und bis zur Reifung glyciniger Synapsen kultiviert werden. Frühere Studien zeigten bei derartigen Experimenten einen Verlust aller GlyR-Cluster in der Retina (Fischer *et al.*, 2000). Mit den heute verfügbaren Antikörpern könnte in organotypischen Retinakulturen speziell die Verteilung von GlyR $\alpha$ 4 und GlyR $\beta$  untersucht werden, um zu klären, ob GlyR $\alpha$ 4-Cluster auch im Gephyrin-freien Gewebe bestehen. Ebenfalls interessant wären Gephyrin-knockdown-Studien unter Beobachtung von GlyR $\alpha$ 4-Clustern, sowie elektrophysiologische Untersuchungen von ON-*Starburst*-Amakrinzellen in der Retina von WT-Mäusen.

## **4.2. Regulation der Clusterbildung von Gephyrin**

Phosphorylierung könnte ein wichtiger Mechanismus zur Regulation des Clusters von Gephyrin sein. Um dies zu untersuchen, wurden hier potentielle Phosphorylierungsstellen in der Linker-Region von Gephyrin durch gezielte Punktmutationen zerstört bzw. eine Phosphorylierung nachgeahmt, um den Einfluss dieser Modifikation auf das Gephyrin-Clustering zu untersuchen. Bisher gab es Hinweise auf eine Phosphorylierung von Gephyrin, jedoch nur wenige zur Modifikation bestimmter Aminosäurereste oder zur Beteiligung bestimmter Kinasen.

### **4.2.1. Einfluss von Phosphataseinhibitoren auf Gephyrincluster**

Kürzlich veröffentlichte Untersuchungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Behandlung von hippocampalen Neuronen mit den Proteinphosphatase-Inhibitoren Calyculin A und Okadeinsäure (*Okadaic acid*; OA) einen Verlust von Gephyrin an inhibitorischen

Postsynapsen bewirkt (Bausen *et al.*, 2010). Die Zugabe dieser Inhibitoren zum Medium von hippocampalen Neuronenkulturen führte zu einer Verkleinerung von Gephyrinclustern bei gleichzeitigem Anstieg der cytoplasmatischen Gephyrin-Immunreaktivität. Eine Beeinflussung der Gephyrinverteilung durch einen während der Behandlung induzierten neuronalen Zelltod konnte nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte TUNEL-Apoptose-Indikationstests zeigten jedoch, dass lediglich Calyculin A-, aber nicht OA-Behandlungen zu einer Erhöhung der Apoptoserate in Neuronen führt (Bausen *et al.*, 2010). Da auch OA die erwähnten Effekte auslöste, ist es unwahrscheinlich, dass allein apoptotische Effekte für die Gephyrin-Umverteilung verantwortlich sind.

Weiterführende Experimente ergaben Hinweise auf eine Interaktion von Proteinphosphatase 1 (PP1) und Gephyrin (Bausen *et al.*, 2010). Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass Gephyrin durch PP1 dephosphoryliert werden könnte. Für Gephyrin ist seinerseits bekannt, dass es an Serin-/Threoninresten phosphoryliert wird (Langosch *et al.*, 1992). Hier konnte gezeigt werden, dass die Alanin- oder Glutamat-Substitution der Serinreste 188 und 194 keinen Einfluss auf die Gephyrinverteilung in Neuronen hat (siehe 3.3.4.). Weder die Kolokalisation von Gephyrin mit VIAAT oder GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2, noch Dichte von Gephyrinclustern oder GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-Fluoreszenzintensitäten wurden durch die eingebrachten Mutationen signifikant geändert. Daher ist der Effekt von Calyculin A und OA vermutlich nicht der Dephosphorylierung von Gephyrin an diesen Positionen zuzuschreiben. Da nur diese Serinreste in den Computerbasierten Vorhersagen als Phosphorylierungsstellen vorgeschlagen werden, ist es denkbar, dass die Proteinphosphatasen enzymatisch auf andere Proteine, wie Gephyrin-assoziierte Faktoren, wirken und somit einen indirekten Effekt auf die Gephyrinverteilung ausüben.

#### **4.2.2. Phosphorylierungsmutanten rekrutieren Dlc1 und ena/VASP in intrazelluläre Blobs**

WT-Gephyrin interagiert mit den Aktinbindeproteinen Dlc1 und ena/Vasp (Fuhrmann *et al.*, 2002; Giesemann *et al.*, 2003; Bausen *et al.*, 2006). Da Interaktionen von Gephyrin mit Cytoskelett-assoziierten Proteinen potentiell auch die Gephyrinlokalisierung beeinflussen könnten, wurde überprüft, ob Dlc1 und ena/VASP in cytoplasmatische Aggregate (Blobs) der Phosphorylierungsmutanten rekrutiert werden. Mehrere Studien verwendeten diese Methode als Proteininteraktionstest in HEK293T-Zellen (Meyer *et al.*, 1995; Kins *et al.*, 2000; Fuhrmann *et al.*, 2002; Giesemann *et al.*, 2003). Vorangegangene Untersuchungen weisen darauf hin, dass Aminosäurereste in der Linker-Region von Gephyrin das Ziel von endogenen Proteinkinasen sind (Prior *et al.*, 1992; Zita *et al.*, 2007). Die Bindung von Dlc1 an Gephyrin erfolgt ebenfalls

in der Linker-Region und wurde mittels Pepscan auf den Bereich zwischen den AS 203-210 lokalisiert (Fuhrmann *et al.*, 2002; Navarro-Lérida *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung der AS 188 und 194 könnte zu einer Konformationsänderung von Gephyrin führen, welche die Art der Dlc1-Bindung und somit die Assoziation zum Cytoskelett beeinflusst. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Phosphorylierungsmutanten zeigten aber keinen offensichtlichen Unterschied in der Rekrutierung von Dlc1 und ena/Vasp, verglichen mit dem WT-Gephyrin-Konstrukt. Dies weist auf eine unveränderte Bindung zwischen Gephyrin und den Cytoskelett assoziierten Proteinen Dlc1 und ena/Vasp hin und passt zu den bisherigen Daten, nach denen die AS 188 und 194 ausserhalb der Binderegion für diese Cytoskelett-Komponenten liegen (Giesemann *et al.*, 2003; Navarro-Lérida *et al.*, 2004).

#### **4.2.3. Subzelluläre Lokalisation der Gephyrinmutanten in Neuronen**

Die spezifische subzelluläre Lokalisation der Gephyrin-Phosphorylierungsmutanten und von WT-Gephyrin wurde durch Expression der entsprechenden GFP-Fusionskonstrukte in hippocampalen Neuronen überprüft. Durch Färbungen der GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-Untereinheit wurde der potentielle Einfluss der Punktmutationen auf die GABA<sub>A</sub>R-Rekrutierungseigenschaften untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine geringe, aber signifikante Reduktion der GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-Fluoreszenzintensität in GFP-Gephyrin<sub>AA</sub> transfizierten Neuronen (siehe 3.3.4.), was auf eine potentielle Rolle dieser Phosphorylierungsstellen bei der Regulation der GABA<sub>A</sub>R-Bindung hinweist. Andere Forschergruppen fanden, dass die Phosphorylierung der Gephyrin-Aminosäurereste S188 und S194 die Voraussetzung für eine Bindung von Pin1 an Gephyrin ist (Zita *et al.*, 2007). Gebundenes Pin1 könnte durch eine Isomerisierungsreaktion zu einer Konformationsänderung von Gephyrin führen, was wiederum die Bindung von Gephyrin an die GlyR $\beta$ -Untereinheit begünstigen soll. Die gezielte Mutation dieser Aminosäuren von Serin zu nicht-phosphorylierbarem Alanin führte in diesen Studien zu einem Verlust von synaptischen GlyR-Clustern (Zita *et al.*, 2007). Jedoch wurde mit ähnlichen Phosphorylierungsmutanten hier kein Verlust von GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2-Clustern beobachtet (siehe 3.3.4.). Allerdings konnten geringe, aber signifikante Verringerungen in der Dichte einzelner Cluster gemessen werden. Die ungleichen Befunde von Glycin- bzw. GABA<sub>A</sub>R lassen sich möglicherweise durch verschiedene Regulationsmechanismen erklären, welche dem Clustering dieser Rezeptoren durch Gephyrin zugrunde liegen (Kneussel & Loeblich, 2007).

Außerdem wurde in transfizierten Neuronen keine Änderung in der subzellulären Lokalisation von Gephyrinclustern oder deren Dichte bzw. Fluoreszenzintensitäten gefunden (siehe 3.3.4.).

Eine durch die Inhibition von Phosphatasen ausgelöste Reduktion von Gephyrinclustern konnte durch die Nachahmung phosphorylierter Aminosäurereste nicht herbeigeführt werden. Daher geht man davon aus, dass die Phosphorylierung der Serine 188 und 194 keinen Einfluss auf das Clustering von Gephyrin ausübt. Dies steht im Einklang mit früheren Studien, welche zeigen, dass Gephyrinmutanten, in denen die S188/S194-enthaltende Linker-Domäne fehlt, keine veränderte Lokalisation oder Clustereigenschaften aufweisen (Fuhrmann *et al.*, 2002). Weiterhin lässt sich folgern, dass die in die Linker-Region eingebrachten Punktmutationen keine Auswirkungen auf die Interaktion der Gephyrin-E-Domäne mit Profilin und ena/VASP (Giesemann *et al.*, 2003; Mammoto *et al.*, 1998) zu haben scheinen. Ebenso wenig wird das in der Linker-Region bindende Dlc1 (Fuhrmann *et al.*, 2002; ) durch die eingebrachten Mutationen von der Rekrutierung in cytoplasmatische Blobs abgehalten. Gephyrin enthält ein RVxF-Motiv, also eine potentielle Bindestelle für PP1 (Egloff *et al.*, 1997; Terrak *et al.*, 2004), und eine Interaktion dieser beiden Proteine konnte durch Immunpräzipitation in Hirnlysaten demonstriert werden (Bausen *et al.*, 2010). Dies sind Hinweise auf eine direkte Bindung von PP1 an Gephyrin, jedoch müssen eindeutige Beweise hierfür noch erbracht werden. Eine Dephosphorylierung von Gephyrin durch PP1 oder PP2A erscheint vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit durchgeführten Mutagenesestudien unwahrscheinlich. Möglicherweise könnte jedoch das synaptische Gephyrinnetzwerk als Bindungsplattform für Phosphatasen fungieren und die so angereicherten Phosphatasen andere Substrate, wie Gephyrin-assoziierte Proteine dephosphorylieren. Die Identifikation synaptischer Substrate von PP1 und PP2A sollte daher ein Ziel zukünftiger Forschung sein. Auch die Art und physiologische Bedeutung der Interaktion zwischen Gephyrin und PP1 sollten durch das gezielte Einbringen von Punktmutationen, die das RVxF-Motiv zerstören, überprüft werden.

### 4.3. Vergleichende Analyse der Genexpression im Gehirn von WT- und Gephyrin-KO-Mäusen

Frühere Studien zur Funktion und Regulation von Gephyrin an inhibitorischen Synapsen beschränkten sich hauptsächlich auf die Identifikation von Protein-Bindungspartnern. So konnten durch Hefe-2-Hybrid-Studien Gephyrin-Bindeproteine wie Collybistin1/2, Dlc-1 und RAFT identifiziert werden (Kins *et al.*, 2000; Fuhrmann *et al.*, 2002; Sabatini *et al.*, 1999). GST-Pulldown- bzw. Co-Aufreinigungs-Experimente führten zur Enthüllung weiterer Bindungspartner wie Tubulin, Pin1, Profilin, ena/VASP, GlyR $\beta$ , Neuroligin-2 und PP1/2A (Schmitt *et al.*, 1987; Kirsch *et al.*, 1991; Mammoto *et al.*, 1998; Giesemann *et al.*, 2003; Zita *et al.*, 2007; Pouloupulos *et al.*, 2009; Bausen *et al.*, 2010). Vor dem Hintergrund dieser Vielzahl von nachgewiesenen Protein-Protein-Interaktionen wurde in dieser Arbeit eine neue Strategie zur Untersuchung des Gephyrin-Clusterings gewählt.

Die Expressionschip-Analyse stellt eine Methode dar, mit der Hinweise auf neue Regulationsmechanismen erhalten und potentielle Interaktionspartner aufgedeckt werden können. Diese Methode wurde bereits erfolgreich in der Alzheimerforschung zur Untersuchung von transgenen Mäusen eingesetzt (Dickey *et al.*, 2003). Hier wurde überprüft, welchen Einfluss der Verlust von Gephyrin auf die Genexpression im Gehirn hat. Einen vergleichbaren Ansatz zur Untersuchung wichtiger Proteine inhibitorischer Synapsen hat es bislang nicht gegeben.

#### 4.3.1. Bewertung der Expressionsprofile von Gephyrin-KO-Mäusen

Für Gephyrin-KO-Mäuse ist bekannt, dass sie innerhalb des ersten Tages nach der Geburt sterben (Feng *et al.*, 1998). Auch Gephyrin-KO-Mäuse, in die als Ersatz für die enzymatische Funktion Gephyrins das pflanzliche Gephyrinhomolog *cnx1* eingebracht wurde, zeigen die gleichen Symptome und frühe postnatale Letalität (Grosskreutz *et al.*, 2003). Unabhängig von der exakten Ursache des schlechten Gesundheitszustandes von neugeborenen Gephyrin-KO-Mäusen steht fest, dass diese Tiere schwerwiegende motorische Defizite aufweisen (Feng *et al.*, 1998). Daher ist zu vermuten, dass sich ihre Symptome, wie Krämpfe, Atemnot und Mangelernährung, in einer veränderten Genexpression im Gehirn widerspiegeln, welche Hinweise auf Gephyrin-assoziierte Genprodukte und Signalkaskaden liefern könnten, die in der Expressionschip-Analyse nachweisbar sein sollten. Andererseits ist zu bedenken, dass derartige Symptome ihrerseits Veränderungen in der Genexpression verursachen können. So könnte der durch Atemnot und Mangelernährung ausgelöste Stress einen sekundären Einfluss auf Expressionsprofile von Mäusen ausüben (Karsson *et al.*, 2007), welcher jedoch nicht in direktem

Zusammenhang mit Gephyrin oder Gephyrin-assoziierten Signalkaskaden steht, sondern eher dem schlechten Gesundheitszustand der Gephyrin-KO-Mäuse geschuldet ist. Daher ist es wichtig, bei der Analyse der Expressionsprofile und der Auswahl der Kandidatengene neben quantitativen Veränderungen in der Genexpression auch andere Kriterien wie die Lokalisation der veränderten Genprodukte o. Ä. mit einfließen zu lassen. Hiermit wurde sichergestellt, dass die untersuchten Kandidatengene in möglichst direktem Zusammenhang mit dem Gephyrinverlust stehen und für die inhibitorische Signalübertragung von Bedeutung sind.

#### 4.3.2. Mögliche Kandidatengene

Die hier durchgeführte Expressionschip-Analyse ergab ein gemitteltes Expressionsprofil von drei WT- und drei Gephyrin-KO-Mäusen. Dessen Ergebnisse zeigen, dass die Expressionsniveaus der RNAs von den durch Protein-Interaktionstests identifizierten Gephyrin-Bindungspartnern (siehe 3.4.) durch den Gephyrinverlust nicht messbar verändert wurden. Solche Interaktionen beeinflussen wahrscheinlich die Verteilung und somit auch die Funktion der Bindungspartner, jedoch vermutlich nicht zwingend das Ausmaß der Genexpression. Es ist also möglich, dass Gephyrin keine wesentlichen genregulatorischen Funktionen im Mausgehirn ausübt. Auf der anderen Seite ergab die Analyse des Expressionsprofils eine Reihe von Transkripten, deren Mengen im KO-Tier offensichtlich verändert waren. Es wurden 26 Genprodukte in eine Liste von Kandidatengenen aufgenommen, für die in WT und Gephyrin-KO-Mäusen signifikant verschiedene Expressionsmengen im Vorderhirn gefunden worden waren (siehe 3.4.3.). Generell waren die gemessenen Transkriptmengen relativ niedrig und hoben sich nur wenig von der 0-Messung ab. Dies könnte erklären, warum die errechneten Unterschiede in der Expression einzelner Gene sehr gering sind (meist < Faktor 2). Basierend auf dieser Liste wurden drei Kandidatengene ausgewählt, deren Expression am stärksten verändert war und die anhand ihrer bekannten Funktion und Lokalisation potentiell Gephyrin-assoziierte Faktoren darstellen könnten:

Die saure Phosphatase Acp1, welche in Gephyrin-KO-Mäusen leicht hochreguliert ist, gehört zur Gruppe der Phosphotyrosin-Proteinphosphatasen mit geringem Molekulargewicht, einer Gruppe von 18 kDa leichten Enzymen aus der Superfamilie der Phosphotyrosin-Proteinphosphatasen (Raugei *et al.*, 2002). Acp1 ist vermutlich in die Kontrolle von mitogenen und adhäsiven Signalen involviert. Unter anderem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Acp1 an der Regulation von Ephrinrezeptor-Kinasen, *platelet derived growth factor* -Rezeptor-Signalwegen und Integrin-Aktivierung (Kikawa *et al.*, 2002; Chiarugi *et al.*, 2002, 2003). Eine mögliche Anreicherung von Acp1 an chemischen Synapsen wurde bislang noch nicht untersucht.

Für EFA6 wurde gefunden, dass dessen Transkripte in Gephyrin-KO-Mäusen leicht herunterreguliert werden. Alle EFA6 Familienmitglieder (EFA6A-D) sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), welche eine hohe Spezifität für den ADP-Ribosylierungsfaktor 6 (ARF6) aufweisen (Sakagami, 2008). ARF6-Proteine sind kleine GTPasen, welche wie EFA6A-D auch im Gehirn exprimiert werden. Für ARF6 konnten in Neuronen vielfältige Funktionen nachgewiesen werden. So ist ARF6 vermutlich an Membrantransportprozessen und der Zytoskelettumorganisation sowie an der Verzweigung von Axonen und Dendriten beteiligt (Hernandez-Deviez *et al.*, 2002, 2004). Des Weiteren spielen ARF6 und EFA6 wichtige Rollen bei der Entstehung und Stabilisierung von dendritischen Spines (Miyazaki *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006). EFA6D ist stark in der postsynaptischen Dichte von Neuronen angereichert (Sakagami *et al.*, 2006).

Das ebenfalls leicht herunterregulierte Frabin gehört zur Familie der Cdc42-spezifischen GEFs und besitzt eine F-Aktin-Bindedomäne sowie eine Membranbindedomäne (Nakanishi & Takai, 2008). Für Collybistin, einen bekannten Gephyrin-Interaktionspartner in Nervenzellen, wurde erst vor kurzem gefunden, dass dessen Membranbindedomänen, nicht jedoch seine Funktion als GEF, maßgeblich an der Regulation von Gephyrinclustern beteiligt ist (Reddy-Alla *et al.*, 2010). Da sich bei Frabin ebenfalls um ein Membran-assoziiertes GEF handelt, ist es möglich, dass dieses Protein, ähnlich wie Collybistin, eine Rolle für die Regulation des Gephyrin-Clusterings spielt.

Bei dem Versuch der Validierung der Microarraydaten durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)-Experimente konnten die im Microarray gemessenen quantitativen Unterschiede in den mRNA-Mengen jedoch für keines dieser Genprodukte reproduziert werden. Dies liegt möglicherweise daran, dass Schwankungen in der PCR-Effizienz zwischen einzelnen Replika-Proben große Auswirkungen auf die anschließend errechneten mRNA-Mengen haben (Wong & Medrano, 2005). So kann eine Abweichung in der PCR-Effizienz von nur 5% bereits einen Unterschied um den Faktor 2 im Endergebnis der quantitativen mRNA-Berechnung bewirken (Freeman *et al.*, 1999). Die im Microarray gemessenen geringen Unterschiede lassen sich daher grundsätzlich nur schwer per qRT-PCR nachweisen. Da die geringen Unterschiede in den durch Microarray-Hybridisierung bestimmten Transkriptmengen zwischen WT- und Gephyrin-KO-Mäusen nicht weiter belegt werden konnten, wurde dieser Ansatz im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergeführt. Jedoch könnten in zukünftigen Arbeiten spezifische Antikörper für Western-Blot-Analysen sowie Immunfärbungen eingesetzt werden, um die Signifikanz der beobachteten Unterschiede zu überprüfen.

#### 4.4. Ausblick

Die Verteilung und Funktion von Gephyrin sowie assoziierter inhibitorischer Rezeptoren wurden in dieser Arbeit mittels drei verschiedener Ansätze untersucht. Expressionschip-Analysen zeigten, dass der Verlust von Gephyrin nicht durch wesentliche Änderungen in der Genexpression kompensiert wird, was die bisherige Vermutung stärkt, dass das Clustering von Rezeptoren an inhibitorischen Synapsen die Hauptfunktion von Gephyrin im Gehirn ist.

In einem zweiten Ansatz wurde die Hemmung des Gephyrin-Clusterings durch Proteinphosphatase-Inhibitoren mittels Mutagenesestudien untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Beteiligung von PP1 und PP2A am Gephyrin-Clustering wahrscheinlich indirekt ist. Zur Aufklärung des Mechanismus, durch den Phosphatasen auf Gephyrin wirken, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. So könnte durch Mutagenesestudien untersucht werden, wie wichtig die Phosphatase-Bindestellen in der Gephyrinsequenz sind, und ob die Herunterregulierung von PP1- und PP2A-Transkripten den gleichen Effekt auslöst wie die Phosphatase-Inhibition. Obwohl aufgrund der hier erbrachten Ergebnisse eine enzymatische Wirkung von PP1 und PP2A auf Gephyrin-assoziierte Faktoren wahrscheinlich erscheint, steht die Identifikation solcher Faktoren noch aus. Auch dies sollte ein Ziel zukünftiger Forschung sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit hergestellt und dessen Bindungsspezifität umfassend validiert. Damit wurde es erstmals möglich, die Verteilung von GlyR $\beta$ -Protein in Geweben und Zellkulturen zu untersuchen. Hierdurch wurde klar, dass GlyR $\beta$ -Transkripte und -Proteinmengen im Säugerhirn sehr ungleich verteilt sind. Bisher ist nicht bekannt, ob dies auf einen raschen Abbau von GlyR $\beta$ -Protein oder eine verminderte Translation von GlyR $\beta$ -mRNA zurückzuführen ist. Eine Analyse der GlyR $\beta$ -Verteilung im ZNS GlyR $\alpha$ -defizienter Mäuse könnte helfen zu klären, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Koexpression von GlyR-Untereinheiten und der Stabilität von GlyR $\beta$ -Protein in Neuronen besteht. Des Weiteren wurden in der Retina Gly $\alpha$ 4-Cluster gefunden, welche in immunocytochemischen Färbungen nicht mit GlyR $\beta$  oder Gephyrin koloalisieren. Für diese Rezeptoren sollte untersucht werden, ob deren Anreicherung ein alternativer, Gephyrin-freier Clustermechanismus zugrundeliegt. Elektronenmikroskopische Analysen von Gly $\alpha$ 4-unabhängiger GlyR $\beta$ -Färbungen der Retina könnten zur Aufklärung der präzisen zellulären Lokalisation dieser Cluster beitragen, während Koimmunpräzipitations-Experimente Hinweise auf neue Gly $\alpha$ 4-Bindeproteine erbringen könnten, welche die synaptische Anreicherung dieser Rezeptorkomplexe, ohne Gephyrin und GlyR $\beta$  ermöglichen. Der neue monoklonale GlyR $\beta$ -

Antikörper erweitert das Repertoire GlyR-Untereinheiten-spezifischer Antikörper und sollte dazu beitragen, unser Verständnis der glycinergen Hemmung im Zentralnervensystem zu vertiefen.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmals ein monoklonaler Antikörper gegen die GlyR $\beta$ -Untereinheit (GlyR $\beta$ ) hergestellt. Zur Immunisierung der Mäuse wurde die 120 AS lange große cytoplasmatische Schleife (engl. *loop*) zwischen den transmembranen Domänen 3 und 4 von GlyR $\beta$  gewählt, da diese nur geringe Sequenzhomologie zu GlyR $\alpha$ -Untereinheiten aufweist. Diese Schleifenregion wurde als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und affinitätsgereinigt. Sowohl die Immunisierung der Mäuse als auch die Herstellung der Hybridoma-Klone wurde in Zusammenarbeit mit Synaptic Systems GmbH (Göttingen) durchgeführt. Die Spezifität der Antikörperbindung an GlyR $\beta$  wurde zunächst in Western Blot-Experimenten mit affinitätsgereinigtem GlyR aus Rattenrückenmark demonstriert. Eine nachfolgende Untersuchung der Antikörperbindestelle führte zur Identifikation der ersten 20 AS des  $\beta$ -loop (GlyR $\beta$ <sub>336-355</sub>) als Epitop. Ein 20 AS kurzes, synthetisches Peptid, welches die Epitop-Sequenz enthielt, war ausreichend, um Färbungen von Western Blots und Gewebeschnitten durch den Antikörper effizient zu verhindern. Außerdem wurden Protokolle für die Antikörperfärbung von GlyR $\beta$  in transfizierten Zelllinien und primären Neuronen aus Rattenrückenmark etabliert. Weiterhin ermöglichte die Herstellung dieses Antikörpers erstmals die direkte immunhistochemische Färbung von GlyR $\beta$ -Protein im ZNS von Mäusen. GlyR $\beta$  konnte hierbei im Hirnstamm, Rückenmark, dem Bulbus olfactorius und der Retina von Mäusen nachgewiesen werden, was zeigt, dass GlyR $\beta$ -Protein weit weniger verbreitet ist als aufgrund von *in situ* Hybridisierungsstudien vermutet. Die gefundene Verteilung von GlyR $\beta$ -Protein unterscheidet sich demnach stark von der Verteilung der GlyR $\beta$ -mRNA, was für eine posttranskriptionelle Regulation der GlyR $\beta$ -Proteinmenge spricht.

Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen an der Retina von Mäusen zeigten, dass GlyR $\beta$  in diesem Gewebe wie erwartet mit Gephyrin an inhibitorischen Synapsen kolokalisiert ist. In Bezug auf GlyR $\alpha$ -Untereinheiten geht man bislang davon aus, dass sie an Synapsen des adulten ZNS immer mit GlyR $\beta$  assoziiert sind, und somit indirekt mit Gephyrin verbunden werden, wodurch das Clustering der Rezeptoren gewährleistet wird. Entgegen dieser Hypothese wurde in Doppelfärbungen von GlyR $\beta$  und GlyR $\alpha$ -Untereinheiten gefunden, dass eine Ansammlung von GlyR $\alpha$ 4-Clustern in der Retina adulter Mäuse vermutlich eine Ausnahme hierzu bildet. Für GlyR $\alpha$ 4-Cluster in Stratum 3 und 4 der IPL konnte gezeigt werden, dass sie teilweise nicht mit GlyR $\beta$ , und zu ebenso großem Teil nicht mit Gephyrin kolokalisiert sind. Dennoch scheinen diese GlyR $\alpha$ 4-Untereinheiten in Clustern angereichert und zudem synaptisch lokalisiert zu sein. Der Mechanismus, durch den GlyR $\alpha$ 4 in Abwesenheit dieser beiden Proteine

an Synapsen immobilisiert wird, ist bislang völlig unklar. Funktionell wäre denkbar, dass derartige Rezeptorkomplexe den synaptischen Eingängen von ON-*Starburst*-Amakrinzellen besondere Leitungseigenschaften verleihen und somit maßgeblich an der Verarbeitung richtungsselektiver Signale in der Retina beteiligt sein könnten.

In dieser Arbeit wurden außerdem Mutagenesestudien durchgeführt, um zu klären, über welchen Mechanismus die Inhibition der Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A) zum Verlust von synaptischem Gephyrin führt. Es konnte gezeigt werden, dass eine direkte Dephosphorylierung von Gephyrin durch PP1 hierfür wahrscheinlich nicht verantwortlich ist, da die Mutation etablierter Phosphorylierungsstellen von Gephyrin keinen, oder nur einen marginalen Einfluss auf dessen synaptische Lokalisation und das Clustering von GABA<sub>A</sub>Rs hatte. Dies spricht dafür, dass PP1/PP2A abhängige Dephosphorylierungs-/Phosphorylierungsprozesse wahrscheinlich andere Gephyrin- oder Cytoskelett-assoziierte Proteine beeinflussen, jedoch nicht direkt an Gephyrin wirken.

Die Erstellung von genomweiten Expressionsprofilen ist eine effiziente Methode zur Identifikation neuer Regulationsmechanismen und potentieller Interaktionspartner von Genprodukten und wurde in dieser Arbeit auf Vorderhirnproben von WT- und Gephyrin-KO-Mäusen vergleichend angewendet. Hierbei wurde gefunden, dass die Transkription bekannter Gephyrin-Interaktionspartner durch den Verlust des Gephyrin-Gens nicht messbar verändert wird. Weil die ermittelten Unterschiede in Transkriptmengen generell sehr gering waren, ist zu vermuten, dass Gephyrin keine wesentlichen genregulatorischen Funktionen im Mausgehirn ausübt. Andererseits ergab die Expressionchip-Analyse Hinweise auf neue Genprodukte, für die in WT- und Gephyrin-KO-Mäusen signifikant verschiedene Transkriptionsmengen gefunden wurden. Die Validierung dieser Daten mit anderen Methoden steht jedoch noch aus.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aguayo LG, van Zundert B, Tapia JC, Carrasco MA, Alvarez FJ. (2004). *Changes on the properties of glycine receptors during neuronal development*. BRAIN RES REV. 47, 33-45.
- Bausen M, Fuhrmann JC, Betz H, O'sullivan GA. (2006). *The state of the actin cytoskeleton determines its association with gephyrin: role of ena/VASP family members*. MOL CELL NEUROSCI. 31, 376-86.
- Bausen M, Weltzien F, Betz H, O'Sullivan GA. (2010). *Regulation of postsynaptic gephyrin cluster size by protein phosphatase 1*. MOL CELL NEUROSCI. 44, 201-9.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., Gertler, F.B. (2002). *Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility*. CELL 109, 509-521.
- Becker CM, Hermans-Borgmeyer I, Schmitt B, Betz H. (1986). *The glycine receptor deficiency of the mutant mouse spastic: evidence for normal glycine receptor structure and localization*. J NEUROSCI. 6, 1358-64.
- Becker CM. (1990). *Disorders of the inhibitory glycine receptor: the spastic mouse*. FASEB J. 4, 2767-74.
- Becker CM, Schmieden V, Tarroni P, Strasser U, Betz H. (1992). *Isoform-selective deficit of glycine receptors in the mouse mutant spastic*. NEURON. 8, 283-9.
- Becker CM, Betz H, Schröder H. (1993). *Expression of inhibitory glycine receptors in postnatal rat cerebral cortex*. BRAIN RES. 606, 220-6.
- Benke D, Fritschy JM, Trzeciak A, Bannwarth W, Mohler H. (1994). *Distribution, prevalence, and drug binding profile of gamma-aminobutyric acid type A receptor subtypes differing in the beta-subunit variant*. J BIOL CHEM. 269, 27100-7.
- Bohlhalter S, Mohler H, Fritschy JM. (1994). *Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: colocalization of glycine- and GABAA-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining*. BRAIN RES. 642, 59-69.
- Bormann J, Rundström N, Betz H, Langosch D. (1993). *Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers*. EMBO J. 12, 3729-37.
- Calamai M, Specht CG, Heller J, Alcor D, Machado P, Vannier C, Triller A. (2009). *Gephyrin oligomerization controls GlyR mobility and synaptic clustering*. J NEUROSCI. 29, 7639-48.

- Carey MF, Peterson CL, Smale ST. (2010). *Purification of epitope-tagged transcription factor IID*. COLD SPRING HARB PROT. PDB. PROT 5450.
- Chiarugi P, Cirri P, Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Buricchi F, Camici G, Raugei G, Ramponi G. (2002). *Insight into the role of low molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMW-PTP) on platelet-derived growth factor receptor (PDGF-r) signaling. LMW-PTP controls PDGF-r kinase activity through TYR-857 dephosphorylation*. J BIOL CHEM. 277, 37331-8.
- Chiarugi P, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R, Raugei G, Symons M, Borrello S, Galeotti T, Ramponi G. (2003). *Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion*. J CELL BIOL. 161, 933-44.
- Choi S, Ko J, Lee JR, Lee HW, Kim K, Chung HS, Kim H, Kim E. (2006). *ARF6 and EFA6A regulate the development and maintenance of dendritic spines*. J NEUROSCI. 26, 4811-9.
- Deleuze C, Alonso G, Lefevre IA, Duvoid-Guillou A, Hussy N. (2005). *Extrasynaptic localization of glycine receptors in the rat supraoptic nucleus: further evidence for their involvement in glia-to-neuron communication*. NEUROSCIENCE. 133, 175-83.
- Dickey CA, Loring JF, Montgomery J, Gordon MN, Eastman PS, Morgan D. (2003). *Selectively reduced expression of synaptic plasticity-related genes in amyloid precursor protein + presenilin-1 transgenic mice*. J NEUROSCI. 23, 5219-26.
- Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B. (1999). *Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons*. J CELL SCI. 112, 811-23.
- Dumoulin A, Triller A, Kneussel M. (2010). *Cellular transport and membrane dynamics of the glycine receptor*. FRONT MOL NEUROSCI. 2, 28.
- Ehinger B, Falck B. (1971). *Autoradiography of some suspected neurotransmitter substances: GABA glycine, glutamic acid, histamine, dopamine, and L-dopa*. BRAIN RES. 33, 157-72.
- Enciso GA, Rempe M, Dmitriev AV, Gavrikov KE, Terman D, Mangel SC. (2010). *A model of direction selectivity in the starburst amacrine cell network*. J COMPUT NEUROSCI. 28, 567-78.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Lüscher B. (1998). *Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin*. NAT NEUROSCI. 1, 563-71.
- Euler T, Hausselt SE, Margolis DJ, Breuninger T, Castell X, Detwiler PB, Denk W. (2009). *Eye-cup scope--optical recordings of light stimulus-evoked fluorescence signals in the retina*. PFLUGERS ARCH. 457, 1393-414.
- Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. (1985). *Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product*. MOL CELL BIOL. 5, 3610-6.

- Feng, G., Tintrup, H., Kirsch, J., Nichol, M.C., Kuhse, J., Betz, H., Sanes, J.R. (1998). *Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity*. SCIENCE 282, 1321-1324.
- Fischer F, Kneussel M, Tintrup H, Haverkamp S, Rauen T, Betz H, Wässle H. (2000). *Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse*. J COMP NEUROL. 427, 634-48.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. (1999). *Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential*. BIOTECHNIQUES. 26, 112-22, 124-5.
- Fuhrmann JC, Kins S, Rostaing P, El Far O, Kirsch J, Sheng M, Triller A, Betz H, Kneussel M. (2002). *Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes*. J NEUROSCI. 22, 5393-402.
- Fujita M, Sato K, Sato M, Inoue T, Kozuka T, Tohyama M. (1991). *Regional distribution of the cells expressing glycine receptor beta subunit mRNA in the rat brain*. BRAIN RES. 560, 23-37.
- Gharizadeh B, Nordström T, Ahmadian A, Ronaghi M, Nyrén P. (2002). *Long-read pyrosequencing using pure 2'-deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-isomer*. ANAL BIOCHEM. 301, 82-90.
- Giesemann T, Schwarz G, Nawrotzki R, Berhörster K, Rothkegel M, Schlüter K, Schrader N, Schindelin H, Mendel RR, Kirsch J, Jockusch BM. (2003). *Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system*. J NEUROSCI. 23, 8330-9.
- Gnad F, Ren S, Cox J, Olsen JV, Macek B, Oroshi M, Mann M. (2007). *PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites*. GENOME BIOL. 8, R250.
- Goldmann, DE. (1943) *Potential, impedance and rectification in membranes*. J GEN PHYSIOL. 27, 37-60.
- Gray, E.G. (1959). *Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex*. NATURE. 183, 1592-3.
- Graham FL, van der Eb AJ. (1973). *Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5*. VIROLOGY. 54, 536-9.
- Graham D, Pfeiffer F, Betz H. (1983). *Photoaffinity-labelling of the glycine receptor of rat spinal cord*. EUR J BIOCHEM. 131, 519-25.
- Greferath U, Brandstätter JH, Wässle H, Kirsch J, Kuhse J, Grünert U. (1994). *Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and in situ hybridization*. VIS NEUROSCI. 11, 721-9.

- Grenningloh G, Gundelfinger E, Schmitt B, Betz H, Darlison MG, Barnard EA, Schofield PR, Seeburg PH. (1987). *Glycine vs GABA receptors*. NATURE. 330, 25-6.
- Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, Betz H. (1990). *Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor*. NEURON. 4, 963-70.
- Griffon N, Büttner C, Nicke A, Kuhse J, Schmalzing G, Betz H. (1999). *Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly*. EMBO J. 18, 4711-21.
- Grimes WN, Zhang J, Graydon CW, Kachar B, Diamond JS. (1999). *Retinal parallel processors: more than 100 independent microcircuits operate within a single interneuron*. NEURON. 65, 873-85.
- Grosskreutz Y, Betz H, Kneussel M. (2003). *Rescue of molybdenum cofactor biosynthesis in gephyrin-deficient mice by a Cnx1 transgene*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. 301, 450-5.
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B. (2005). *The b-Subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors*. NEURON. 45, 727-739.
- Guidotti A, Auta J, Davis JM, Dong E, Grayson DR, Veldic M, Zhang X, Costa E. (2005). *GABAergic dysfunction in schizophrenia: new treatment strategies on the horizon*. PSYCHOPHARMACOLOGY (BERL). 180, 191-205.
- Gundelfinger ED, tom Dieck S. (2000). *Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain*. NATURWISSENSCHAFTEN. 87, 513-23.
- Harvey RJ, Schmieden V, Von Holst A, Laube B, Rohrer H, Betz H. (2000). *Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge*. EUR. J. NEUROSCI. 12, 994-1001
- Harvey RJ, Topf M, Harvey K, Rees MI. (2008). *The genetics of hyperekplexia: more than startle!* TRENDS GENET. 24, 439-47.
- Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, Lingenfelter SE, Pearce BR, Lundgren J, Owen MJ, Smart TG, Lüscher B, Rees MI, Harvey RJ. (2004). *The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering*. J NEUROSCI. 24, 5816-26.
- Haverkamp S, Wässle H. (2000). *Immunocytochemical analysis of the mouse retina*. J COMP NEUROL. 424, 1-23.
- Haverkamp S, Müller U, Harvey K, Harvey RJ, Betz H, Wässle H. (2003). *Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha3 subunit*. J COMP NEUROL. 465, 524-39.

- Haverkamp S, Müller U, Zeilhofer HU, Harvey RJ, Wässle H. (2004). *Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha2 subunit*. J COMP NEUROL. 477, 399-411.
- Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S, Wässle H. (2007). *Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit*. J COMP NEUROL. 500, 693-707.
- Hirose S, Mohny RP, Okada M, Kaneko S, Mitsudome A. (2003). *The genetics of febrile seizures and related epilepsy syndromes*. BRAIN DEV. 25, 304-12. REVIEW.
- Hoch W, Betz H, Becker CM. (1989). *Primary cultures of mouse spinal cord express the neonatal isoform of the inhibitory glycine receptor*. NEURON. 3, 339-48.
- Hormuzdi SG, Filippov MA, Mitropoulou G, Monyer H, Bruzzone R. (2003). *Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA. 1662, 113-37.
- Huxley AF, Stämpfli R. (1949). *Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres*. J PHYSIOL. 108, 315-39.
- Ivanova E, Müller U, Wässle H. (2006). *Characterization of the glycinergic input to bipolar cells of the mouse retina*. EUR J NEUROSCI. 23, 350-64.
- Johann S, Kampmann E, Denecke B, Arnold S, Kipp M, Mey J, Beyer C. (2006). *Expression of enzymes involved in the prostanoid metabolism by cortical astrocytes after LPS-induced inflammation*. J MOL NEUROSCI. 34, 177-85.
- Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, Träskman-Bendz L, Goddard AW, Brundin L, Shekhar A. (2010). *A key role for orexin in panic anxiety*. NAT MED. 16, 111-5.
- Jusuf PR, Haverkamp S, Grünert U. (2005). *Localization of glycine receptor alpha subunits on bipolar and amacrine cells in primate retina*. J COMP NEUROL. 488, 113-28.
- Karssen AM, Her S, Li JZ, Patel PD, Meng F, Bunney WE Jr, Jones EG, Watson SJ, Akil H, Myers RM, Schatzberg AF, Lyons DM. (2007) *Stress-induced changes in primate prefrontal profiles of gene expression*. MOL PSYCHIATRY. 12, 1089-102.
- Kikawa KD, Vidale DR, Van Etten RL, Kinch MS. (2002). *Regulation of the EphA2 kinase by the low molecular weight tyrosine phosphatase induces transformation*. J BIOL CHEM. 277, 39274-9.
- Kingsmore SF, Giros B, Suh D, Bieniarz M, Caron MG, Seldin MF. (1994). *Glycine receptor beta-subunit gene mutation in spastic mouse associated with LINE-1 element insertion*. NAT GENET. 7, 136-41.
- Kins S, Betz H, Kirsch J. (2000). *Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin*. NAT NEUROSCI. 3, 22-9.

- Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H. (1991). *The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin*. J BIOL CHEM. 266, 22242-5.
- Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H. (1993). *Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons*. NATURE 366, 745-748.
- Kneussel M, Brandstatter JH, Laube B, Stahl S, Muller U, Betz H. (1999). *Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice*. J NEUROSCI 19, 9289-9297.
- Kneussel M, Betz H. (2000). *Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model*. TRENDS NEUROSCI 23, 429-435.
- Kneussel M, Brandstätter JH, Gasnier B, Feng G, Sanes JR, Betz H. (2001). *Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABAA receptor subtypes*. MOL. CELL. NEUROSCI. 17, 973-982.
- Kneussel M, Loeblich S. (2007). *Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors*. BIOL CELL. 99, 297-309.
- Kolb H, West RW. (1977). *Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat*. J NEUROCYTOL. 6, 155-70.
- Krieg AM. (2002). *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. ANNU REV IMMUNOL. 20, 709-60.
- Kubota H, Alle H, Betz H, Geiger JR. (2010). *Presynaptic glycine receptors on hippocampal mossy fibers*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. 393, 587-91.
- Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V, Betz H. (1991). *Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor*. FEBS LETT. 283, 73-7.
- Kuhse J, Laube B, Magalei D, Betz H. (1993). *Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry*. NEURON. 11, 1049-56.
- Langosch D, Hoch W, Betz H. (1992). *The 93 kDa protein gephyrin and tubulin associated with the inhibitory glycine receptor are phosphorylated by an endogenous protein kinase*. FEBS LETT. 298, 113-7.
- Lardi-Studler B, Smolinsky B, Petitjean CM, Koenig F, Sidler C, Meier JC, Fritschy JM, Schwarz G. (2007). *Vertebrate-specific sequences in the gephyrin E-domain regulate cytosolic aggregation and postsynaptic clustering*. J CELL SCI. 120, 1371-82.
- Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. (2002). *Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses?* TRENDS PHARMACOL SCI. 23, 519-27.

- Levi, S., Logan, S. M., Tovar, K. R. & Craig, A. M. (2004). *Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons*. J. NEUROSCI. 24, 207-217.
- Li FQ, Mofunanya A, Harris K, Takemaru K. (2008) *Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity*. J CELL BIOL. 30, 1141-54.
- Liu MT, Wuebbens MM, Rajagopalan KV, Schindelin H. (2000). *Crystal structure of the gephyrin-related molybdenum cofactor biosynthesis protein MogA from Escherichia coli*. J BIOL CHEM. 275, 1814-22.
- Lu KP, Hanes SD, Hunter T. (1996). *A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis*. NATURE. 380, 544-7.
- Lüscher B, Keller CA. (2004). *Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses*. PHARMACOL THER. 102, 195-221.
- Maas C, Belgardt D, Lee HK, Heisler FF, Lappe-Siefke C, Magiera MM, van Dijk J, Hausrat TJ, Janke C, Kneussel M. (2009). *Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo*. PROC NATL ACAD SCI U S A. 106, 8731-6.
- Majumdar S, Heinze L, Haverkamp S, Ivanova E, Wässle H. (2007). *Glycine receptors of A-type ganglion cells of the mouse retina*. VIS NEUROSCI. 24, 471-87.
- Majumdar S, Weiss J, Wässle H. (2009). *Glycinergic input of widefield, displaced amacrine cells of the mouse retina*. J PHYSIOL. 587, 3831-49.
- Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H. (1991a). *Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor*. J BIOL CHEM. 266, 2048-53.
- Malosio ML, Marquèze-Pouey B, Kuhse J, Betz H. (1991b). *Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain*. EMBO J. 10, 2401-9.
- Martens H, Weston MC, Boulland JL, Grønberg M, Grosche J, Kacza J, Hoffmann A, Matteoli M, Takamori S, Harkany T, Chaudhry FA, Rosenmund C, Erck C, Jahn R & Härtig W (2008). *Unique Luminal Localization of VGAT-C Terminus Allows for Selective Labeling of Active Cortical GABAergic Synapses*. JOURNAL OF NEUROSCIENCE 28. 13125-13131.
- Masland RH. (2001). *Neuronal diversity in the retina*. CURR OPIN NEUROBIOL. 11, 431-6.
- Matzenbach B, Maulet Y, Sefton L, Courtier B, Avner P, Guénet JL, Betz H. (1994). *Structural analysis of mouse glycine receptor alpha subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant*. J BIOL CHEM. 269, 2607-12.
- Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, Hotta I, Imamura H, Takahashi K, Matsuura Y, Shirao T, Takai Y. (1998). *Interactions of drebrin and gephyrin with profilin*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. 243, 86-9.

- Mangin JM, Baloul M, Prado De Carvalho L, Rogister B, Rigo JM, Legendre P. (2003). *Kinetic properties of the alpha2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning.* J PHYSIOL. 553, 369-86.
- Meier JC, Henneberger C, Melnick I, Racca C, Harvey RJ, Heinemann U, Schmieden V, Grantyn R. (2005). *RNA editing produces glycine receptor alpha3 (P185L), resulting in high agonist potency.* NAT NEUROSCI. 8, 736-44.
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D. (1995). *Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit.* NEURON. 15, 563-72.
- Milani N, Mühlhardt C, Weber RG, Lichter P, Kioschis P, Poustka A, Becker CM. (1998). *The human glycine receptor beta subunit gene (GLRB): structure, refined chromosomal localization, and population polymorphism.* GENOMICS. 50, 341-5.
- Miyazaki H, Yamazaki M, Watanabe H, Maehama T, Yokozeki T, Kanaho Y. (2005). *The small GTPase ADP-ribosylation factor 6 negatively regulates dendritic spine formation.* FEBS LETT. 579, 6834-8.
- Mutch DM, Berger A, Mansourian R, Rytz A, Roberts MA. (2002). *The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data.* BMC BIOINFORMATICS. 3:17.
- Mühlhardt C, Fischer M, Gass P, Simon-Chazottes D, Guénet JL, Kuhse J, Betz H, Becker CM. (1994). *The spastic mouse: aberrant splicing of glycine receptor beta subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element.* NEURON. 13, 1003-15.
- Nakanishi H, Takai Y. (2008). *Frabin and other related Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factors couple the actin cytoskeleton with the plasma membrane.* J CELL MOL MED. 12, 1169-76.
- Navarro C, Puthalakath H, Adams JM, Strasser A, Lehmann R. (2004). *Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate.* NAT CELL BIOL. 6, 427-35.
- Navarro-Lérida I, Martínez Moreno M, Roncal F, Gavilanes F, Albar JP, Rodríguez-Crespo I. (2004). *Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8.* PROTEOMICS. 4, 339-46.
- Nikolic Z, Laube B, Weber RG, Lichter P, Kioschis P, Poustka A, Mühlhardt C, Becker CM. (1998). *The human glycine receptor subunit alpha3. Glra3 gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts.* J BIOL CHEM. 273, 19708-14.
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. (1990). *A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells.* NUCLEIC ACIDS RES. 18, 6169.
- Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB. (2003). *Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs.* NUCLEIC ACIDS RES. 31, 3635-41.

- Oertel J, Villmann C, Kettenmann H, Kirchhoff F, Becker CM. (2007). *A novel glycine receptor beta subunit splice variant predicts an unorthodox transmembrane topology. Assembly into heteromeric receptor complexes.* J BIOL CHEM. 282, 2798-807.
- Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsubara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H, Takai Y. (2002). *Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1.* J CELL BIOL. 158, 577-90.
- Paarmann I, Schmitt B, Meyer B, Karas M, Betz H. (2006a). *Mass spectrometric analysis of glycine receptor-associated gephyrin splice variants.* J BIOL CHEM. 281, 34918-25.
- Paarmann I, Saiyed T, Schmitt B, Betz H. (2006b). *Gephyrin: does splicing affect its function?* BIOCHEM SOC TRANS. 34, 45-7.
- Papadopoulos T, Korte M, Eulenburg V, Kubota H, Retiounskaia M, Harvey RJ, Harvey K, O'Sullivan GA, Laube B, Hülsmann S, Geiger JR, Betz H. (2007). *Impaired GABAergic transmission and altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice.* EMBO J. 26, 3888-3899.
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H. (1982). *Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord.* J BIOL CHEM. 257, 9389-93.
- Pfeiffer F, Simler R, Grenningloh G, Betz H. (1984). *Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord.* PROC NATL ACAD SCI U S A. 81, 7224-7.
- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, Jedlicka P, Schwarzacher SW, Betz H, Harvey RJ, Brose N, Zhang W, Varoqueaux F. (2009). *Neurologin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin.* NEURON. 63, 628-42.
- Pow DV. (1998). *Transport is the primary determinant of glycine content in retinal neurons.* J NEUROCHEM. 70, 2628-36.
- Pow DV, Hendrickson AE. (1999). *Distribution of the glycine transporter glyt-1 in mammalian and nonmammalian retinæ.* VIS NEUROSCI. 16, 231-9.
- Pow DV, Hendrickson AE. (2000). *Expression of glycine and the glycine transporter Glyt-1 in the developing rat retina.* VIS NEUROSCI. 17, 1R-9R.
- Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER. (2001). *Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR.* J MOL DIAGN. 3, 26-31.

- Ranganathan R, Lu KP, Hunter T, Noel JP. (1997). *Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent.* CELL. 89, 875-86.
- Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. (2002). *Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart.* CELL MOL LIFE SCI. 59, 941-9.
- Reddy-Alla S, Schmitt B, Birkenfeld J, Eulenburg V, Dutertre S, Böhringer C, Götz M, Betz H, Papadopoulos T. (2010). *PH-domain-driven targeting of collybistin but not Cdc42 activation is required for synaptic gephyrin clustering.* EUR J NEUROSCI. 31, 1173-84.
- Rees MI, Lewis TM, Kwok JB, Mortier GR, Govaert P, Snell RG, Schofield PR, Owen MJ. (2002). *Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB).* HUM MOL GENET. 11, 853-60.
- Ruiz-Gómez A, Morato E, García-Calvo M, Valdivieso F, Mayor F Jr. (1990). *Localization of the strychnine Binding site on the 48 kDa subunit of the Glycine receptor.* BIOCHEMISTRY. 29, 7033-40.
- Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH. (1999). *Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling.* SCIENCE. 284, 1161-4.
- Saiyed T, Paarmann I, Schmitt B, Haeger S, Sola M, Schmalzing G, Weissenhorn W, Betz H. (2006). *Molecular basis of gephyrin clustering at inhibitory synapses: role of G- and E-domain interactions.* J BIOL CHEM. 282, 5625-32.
- Sakagami H, Suzuki H, Kamata A, Owada Y, Fukunaga K, Mayanagi H, Kondo H. (2006). *Distinct spatiotemporal expression of EFA6D, a guanine nucleotide exchange factor for ARF6, among the EFA6 family in mouse brain.* BRAIN RES. 1093, 1-11.
- Sakagami H. (2008). *The EFA6 family: guanine nucleotide exchange factors for ADP ribosylation factor 6 at neuronal synapses.* TOHOKU J EXP MED. 214, 191-8.
- Sassoè-Pognetto M, Wässle H, Grünert U. (1994). *Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the alpha 1 subunit of the glycine receptor.* J NEUROSCI. 14, 5131-46.
- Sato K, Zhang JH, Saika T, Sato M, Tada K, Tohyama M. (1991). *Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: an analysis using in situ hybridization histochemistry.* NEUROSCIENCE. 43, 381-95.
- Saiyed T, Paarmann I, Schmitt B, Haeger S, Sola M, Schmalzing G, Weissenhorn W, Betz H. (2006). *Molecular basis of gephyrin clustering at inhibitory synapses: role of G- and E-domain interactions.* J BIOL CHEM. 282, 5625-32.
- Scheffer IE, Berkovic SF. (2003). *The genetics of human epilepsy.* TRENDS PHARMACOL SCI. 24, 428-33.

- Schmieden V, Kuhse J, Betz H. (1992). *Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor alpha subunits: identification of amino acid residues involved in taurine activation*. EMBO J. 11, 2025-32.
- Schmitt B, Knaus P, Becker CM, Betz H. (1987). *The Mr 93,000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein*. BIOCHEMISTRY. 26, 805-11.
- Schwarz G, Schrader N, Mendel RR, Hecht HJ, Schindelin H. (2001). *Crystal structures of human gephyrin and plant Cnx1 G domains: comparative analysis and functional implications*. J MOL BIOL. 312, 405-18.
- Schwarz G. (2005). *Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency*. CELL MOL LIFE SCI. 62, 2792-810.
- Setou M, Seog DH, Tanaka Y, Kanai Y, Takei Y, Kawagishi M, Hirokawa N. (2002). *Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites*. NATURE. 417, 83-7.
- Shen M, Stukenberg PT, Kirschner MW, Lu KP. (1998). *The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins*. GENES DEV. 12, 706-20.
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. (2004). *Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome*. J BIOL CHEM. 279, 41422-35.
- Singer JH, Talley EM, Bayliss DA, Berger AJ. (1998). *Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons*. J NEUROPHYSIOL. 80, 2608-20.
- Smolinsky B, Eichler SA, Buchmeier S, Meier JC, Schwarz G. (2008). *Splice-specific functions of gephyrin in molybdenum cofactor biosynthesis*. J BIOL CHEM. 283, 17370-9.
- Sola M, Kneussel M, Heck IS, Betz H, Weissenhorn W. (2001). *X-ray crystal structure of the trimeric N-terminal domain of gephyrin*. J BIOL CHEM. 276, 25294-301.
- Sola M, Bavro VN, Timmins J, Franz T, Ricard-Blum S, Schoehn G, Ruigrok RW, Paarmann I, Saiyed T, O'Sullivan GA, Schmitt B, Betz H, Weissenhorn W. (2004). *Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin*. EMBO J. 23, 2510-9.
- Stallmeyer B, Nerlich A, Schiemann J, Brinkmann H, Mendel RR. (1995). *Molybdenum cofactor biosynthesis: the Arabidopsis thaliana cDNA cnx1 encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three Escherichia coli proteins*. PLANT J. 8, 751-62.
- Stallmeyer B, Schwarz G, Schulze J, Nerlich A, Reiss J, Kirsch J, Mendel RR. (1999). *The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells*. PROC NATL ACAD SCI U S A. 96, 1333-8.

- Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H. (1992). Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *NEURON*. 9, 1155-61.
- Thomas, P., Mortensen, M., Hosie, A. M. & Smart, T. G. (2005). *Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses*. *NATURE NEUROSCI*. 8, 889-897.
- tom Dieck S, Brandstätter JH. (2006). *Ribbon synapses of the retina*. *CELL TISSUE RES*. 326, 339-46.
- Tohyama M, Wanaka A, Araki T, Betz H, Malbon CC. (1989). *Localization of glycine and beta-adrenergic receptors in the rat brain*. *ARCH HISTOL CYTOL*. 52, 39-48.
- Tretter V, Jacob TC, Mukherjee J, Fritschy JM, Pangalos MN, Moss SJ. (2008). *The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin*. *J NEUROSCI*. 28, 1356-65.
- Triller A, Cluzaud F, Pfeiffer F, Betz H, Korn H. (1985). *Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study*. *J CELL BIOL*. 101, 683-8.
- Tyagarajan SK, Fritschy JM. (2010). *GABA(A) receptors, gephyrin and homeostatic synaptic plasticity*. *J PHYSIOL*. 588, 101-6.
- Ulrich D, Bettler B. (2007). *GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity*. *CURR OPIN NEUROBIOL*. 7, 298-303.
- Vandenberg RJ, French CR, Barry PH, Shine J, Schofield PR. (1992a). *Antagonism of ligand-gated ion channel receptors: two domains of the glycine receptor alpha subunit form the strychnine-binding site*. *PROC NATL ACAD SCI USA*. 89, 1765-9
- Vandenberg RJ, Handford CA, Schofield PR. (1992b). *Distinct agonist- and antagonist-binding sites on the glycine receptor*. *NEURON*. 9, 491-6.
- Vaney DI, Nelson JC, Pow DV. (1998). *Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina*. *J NEUROSCI*. 18, 10594-602.
- Vaney DI, Taylor WR. (2002). *Direction selectivity in the retina*. *CURR OPIN NEUROBIOL*. 12, 405-10.
- Wässle H, Koulen P, Brandstätter JH, Fletcher EL, Becker CM. (1998). *Glycine and GABA receptors in the mammalian retina*. *VISION RES*. 38, 1411-30.
- Wässle H. (2004). *Parallel processing in the mammalian retina*. *NAT REV NEUROSCI*. 5, 747-57.
- Wässle H, Heinze L, Ivanova E, Majumdar S, Weiss J, Harvey RJ, Haverkamp S. (2009). *Glycinergic transmission in the Mammalian retina*. *FRONT MOL NEUROSCI*. 2, 6.

- Wisden W, Seeburg PH. (1993). *Mammalian ionotropic glutamate receptors*. CURR OPIN NEUROBIOL. 3, 291-8.
- Wong ML, Medrano JF. (2005). *Real-time PCR for mRNA quantitation*. BIOTECHNIQUES. 39, 75-85.
- Zheng JJ, Lee S, Zhou ZJ. (2004). *A developmental switch in the excitability and function of the starburst network in the mammalian retina*. NEURON. 44, 851-64.
- Zhou ZJ, Fain GL. (1995). *Neurotransmitter receptors of starburst amacrine cells in rabbit retinal slices*. J NEUROSCI. 15, 5334-45.
- Zita MM, Marchionni I, Bottos E, Righi M, Del Sal G, Cherubini E, Zacchi P. (2010). *Post-phosphorylation prolyl isomerisation of gephyrin represents a mechanism to modulate glycine receptors function*. EMBO J. 26, 1761-71.